



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Patrícia Gonçalves Matos

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Olga Cardoso e pela Dra. Alice Mendes apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2021

Patrícia Gonçalves Matos

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Olga Cardoso e dYUDra. Alice Mendes apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Estágio realizado no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra entre janeiro e junho de 2021, englobando as valências de Hematologia, Microbiologia, Bioquímica e Imunologia.

Outubro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar ao Dr. Fernando Rodrigues pela disponibilidade, pela simpatia e pela oportunidade de realizar o meu estágio no serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC).

Agradeço às minhas orientadoras externas, Dra. Alice e Dra. Cristiana, por todo o apoio e dedicação que tiveram. Admiro imenso todo o esforço feito para que conseguíssemos ter a melhor e mais completa experiência de estágio. Agradeço também a toda a equipa do CHUC que nos acolheu da melhor maneira possível. Uma equipa constituída por pessoas que realmente tinham intenção de transmitir o seu conhecimento, sempre disponíveis para esclarecer quaisquer dúvidas e que valorizaram bastante todo o nosso trabalho.

Agradeço à minha orientadora interna, a Professora Doutora Olga Cardoso, pela orientação e disponibilidade, assim como pelo conhecimento transmitido e rigor exigidos, que tanto me ajudaram a crescer como profissional.

Agradeço à minha colega de estágio, a Inês, por ter sido uma interessante surpresa e por ter feito este difícil percurso comigo.

Agradeço à minha família por toda a paciência, sacrifício e carinho incondicionais.

Agradeço aos meus amigos: Bea, Tati, Ruben, Andreia e Inês, por serem das melhores partes da minha vida.

Agradeço à Professora Doutora Sónia por me ter ajudado a perceber o meu caminho e por ser a pessoa incrível que é. Espero um dia conseguir retribuir todo o carinho que me deu e vir a ser metade da profissional que é.

E por fim, agradeço a mim própria por todo o trabalho e esforço feitos ao longo dos últimos meses. O panorama em que vivemos atualmente pode mexer com a saúde mental de qualquer um, tornando toda a adaptação a algo novo e diferente ainda mais complicada. O mais importante foi que, apesar das dificuldades, consegui tirar o melhor desta experiência e ficar orgulhosa de todo o meu percurso.

Índice

Abreviaturas	xi
Resumo	xiii
Abstract	xiii
1. Introdução	1
2. Caracterização do Laboratório	1
3. Controlo de Qualidade	2
4. Hematologia	3
4.1 Hemocitometria	4
4.1.1 Eritrograma	5
4.1.2 Leucograma	7
4.1.3 Trombograma	8
4.2 Velocidade de sedimentação (VS)	9
4.3 Hemostase	9
4.3.1 Método Coagulométrico	11
4.3.2 Método Imunológico	14
4.3.3 Método cromogénico	15
4.4 Tromboelastometria rotacional	15
5. Citogenética	16
6. Hibridização de fluorescência <i>in situ</i> (FISH)	17
7. Caso Clínico de Hematologia	18
8. Microbiologia	21
8.1 Bacteriologia	22
8.1.1 Exame direto por coloração de Gram	22
8.1.2 Exame cultural	23
8.1.3 Exame direto a fresco	27
8.1.4 Identificação do microrganismo	27
8.1.5 Teste de suscetibilidade aos antibióticos (TSA)	27
8.2 Micologia	35
8.3 Parasitologia	37
8.3.1 <i>Plasmodium</i> spp.	38
8.3.2 <i>Leishmania</i> spp.	39
8.3.3 <i>Trypanosoma</i> spp.	39
8.3.4 <i>Ascaris lumbricoides</i>	40
8.3.5 <i>Schistosoma haematobium</i>	40
8.4 Micobacteriologia	41
8.4.1 BACTEC™ 9120	42
8.4.2 Esfregaço corado pela coloração de Ziehl-Neelsen modificada	42
8.4.3 Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias (MGIT)	42
8.4.4 Meio de cultura Löwenstein-Jensen (LJ)	43

8.5 Serologia.....	43
8.5.1 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)	44
8.5.2 Ensaio de Fluorescência Enzimática (ELFA).....	44
8.5.3 Imunoensaio de Micropartículas por Quimioluminescência (CMIA)	44
8.5.4 Rosa de Bengala.....	45
8.5.5 Rapid Plasma Reagin (RPR).....	45
8.5.6 Treponema Passive Particle Agglutination (TP-PA).....	45
8.5.7 Imunofluorescência Indireta (IFI).....	45
8.6 Biologia Molecular.....	47
8.6.1 GeneXpert® (Cepheid).....	47
8.6.2 FilmArray® Torch (bioMérieux)	48
8.6.3 VitaPCR (Credo Diagnostics)	49
8.7 Virologia	49
9. Caso Clínico n.º1 de Microbiologia.....	50
10. Caso Clínico n.º2 de Microbiologia.....	51
11. Bioquímica	54
12. Imunologia	55
13. Conclusão	57
14. Bibliografia.....	59
15. Anexos	65

Índice de Figuras

Figura 1 - Modelo Clássico da Cascata de Coagulação.....	10
Figura 2 - Tubo lipémico do lado esquerdo e presença de coágulo no tubo do lado direito....	10
Figura 3 - Gráfico de aPTT onde se pode observar a fase de interação dos componentes, iniciação da coagulação e estabilização do coágulo.....	12
Figura 4 - Teste de screening STic Expert® HIT (Stago).....	14
Figura 5 - Tromboelastometria rotacional. Inclui os parâmetros Intem, Extem, Fibtem e Aptem.....	15
Figura 6 - Imagens obtidas a partir da técnica de FISH utilizando uma sonda de fusão.....	17
Figura 7 - A - Célula sugestiva de promielócito onde se observa o núcleo bilobado e os ramalhetes de bastonetes de Auer (<i>faggot cell</i>). B - Célula sugestiva de promielócito hipergranular.....	19
Figura 8 - A - Cariótipo com t(15;17). B - Imagem de FISH utilizando a sonda de fusão LSI t(15;17) PML/RARA Dual Color Dual Fusion.....	20
Figura 9 - A - Placa de GS com <i>S. aureus</i> isolado apresentando colónias brancas/amareladas, com bordos bem definidos, brilhantes. Também é possível observar a β hemólise. B - Placa de PVX com <i>Haemophilus spp.</i> isolado apresentando colónias pequenas, translúcidas e lisas. C - Placa de GS com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> apresentando colónias planas, com brilho metálico, cheiro característico e que realizam β hemólise.....	26
Figura 10 - Levedura <i>Rhodotorula rubra</i>	35
Figura 11 - Observação ao microscópio de fluorescência de quistos de <i>Pneumocystis jirovecii</i> numa amostra de LBA.....	36
Figura 12 - A - Esfregaços de sangue periférico fino onde se observam trofozoítos de <i>P. falciparum</i> (em anel) e os fenómenos de poliparasitismo e de bordo. B - Esfregaço de sangue periférico fino onde se observam gametócitos (forma de “banana”) com pigmento malárico acastanhado.....	38
Figura 13 - Esfregaço em gota espessa onde se observa o esquizonte de <i>P. malariae</i> com oito merozoítos.....	39
Figura 14 - Esfregaço de sangue periférico fino onde se observa a forma amastigota de <i>Leishmania sp.</i>	39
Figura 15 - A - Esfregaço sanguíneo fino com tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> (cinetoplasto posterior ao núcleo, membrana ondulante, forma em C ou U, flagelo na região anterior). B - Esfregaço sanguíneo fino com tripomastigotas de <i>T. brucei</i> (mesma características apresentadas por <i>T. cruzi</i> exceto a forma que se apresenta mais ondulada).....	40

Figura 16 - Dois vermes adultos de <i>A. lumbricoides</i> , redondos, com coloração rosada, extremidades afiladas e cujo tamanho varia entre 15 e 25 cm.....	40
Figura 17 - Ovo embrionado de <i>S. haematobium</i> com cílios e espícula terminal.....	40
Figura 18 - Esfregaço corado pela coloração de Zhiel-Neelsen modificada onde se observam cordas sugestivas de <i>M. tuberculosis complex</i>	42
Figura 19 - Tubo de LJ com uma colónia sugestiva de <i>M. tuberculosis complex</i>	43
Figura 20 - Teste negativo de Rosa de Bengala.....	45
Figura 21 - Exemplo de testes TP-PA.....	45
Figura 22 - A - Esfregaço corado pela coloração de Gram onde se observam diplococos de Gram negativo. B - Meio GS com colónias de <i>N. gonorrhoeae</i> que se apresentam esbranquiçadas, translúcidas e brilhantes.....	50
Figura 23 - Antibiograma manual através de E-test para espectinomicina e ceftriaxona.....	51
Figura 24 - A - Esfregaço corado pela coloração de Gram onde é possível observar células leveduriformes a gemular e respetivas cápsulas. B - Sementeira por inundação de LCR em PVX, onde é possível observar <i>C. neoformans</i> com colónias esbranquiçadas, mucóides e brilhantes.....	53
Figura 25 - Processo manual para caracterização da composição de cálculos renais.....	55
Figura 26 - Exemplo de padrão de fluorescência observado utilizando a técnica de IFI.....	55

Índice de Tabelas

Tabela i - Índices Eritrocitários.....	5
Tabela ii - Intervalos de referência de leucócitos.....	7
Tabela iii - Hemograma do Caso Clínico de Hematologia.....	18
Tabela iv - Parâmetros da coagulação do Caso Clínico de Hematologia.....	19
Tabela v - Meios de cultura utilizados no laboratório de Microbiologia do CHUC.....	23
Tabela vi - Caldos de enriquecimento utilizados no laboratório de Microbiologia do CHUC.....	26
Tabela vii - Avaliação do crescimento de microrganismos em uroculturas.....	29
Tabela viii - Técnicas e exemplos de parâmetros avaliados no setor da Autoimunidade.....	56
Tabela ix - Técnicas e exemplos de parâmetros avaliados no setor da Imunologia.....	56

Abreviaturas

Anti PF4 - Anti Fator Plaquetar 4

Anti-HBc total - Anticorpo total de *core* da hepatite B

Anti-HBe - Anticorpo anti-e da hepatite B

aPTT - Tempo de tromboplastina parcial ativada

ATP - Adenosina trifosfato

BCSA - Gelose para *Burkholderia cepacia*

BHI - Brain Heart Infusion

CAM - Gelose Campyloset

CHUC - Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

CID - Coagulação Intravascular Disseminada

CIM - Concentração Mínima Inibitória

CIN - Gelose *Yersinia*

CLED - Gelose cistina-lactose-deficiente em eletrólitos

CM - Cooked-Meat

CMIA - Imunoensaio de Micropartículas por Quimioluminescência

CNA - Gelose Columbia ANC + 5% sangue de carneiro

COVID-19 - Coronavirus Disease 2019

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica

EDTA K₃ - Ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássico

ELFA - Ensaio de Fluorescência Enzimática

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FEIA - Imunoensaio Fluoroenzimático

FISH - Hibridização de fluorescência *in situ*

FTA-Abs - Fluorescent Treponemal Antibody Absorption Test

GS - Gelose de sangue

HAE - Gelose chocolate *Haemophilus*

Hb - Hemoglobina

HBeAg - Antígeno e da hepatite B

HBsAg - Antígeno de superfície da hepatite B

HCT - Hematócrito

HEKT - Gelose Hektoen

HIT - Trombocitopenia Induzida por Heparina

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

HG - Hospital Geral dos Covões

HP - Hospital Pediátrico

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HPLC-MS - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massa

HUC - Hospital Universitário de Coimbra

IFI - Imunofluorescência Indireta

INR - Rácio Internacional Normalizado

ISI - Índice de Sensibilidade Internacional

ITL - Inibidor Tipo Lúpus

ITU - Infecções do trato urinário

LBA - Lavado broncoalveolar

LCR - Líquido cefalorraquidiano

LDH - Lactato desidrogenase

LES - Lúpus eritematoso sistémico

LJ - Löwenstein-Jensen

Maldi-TOF-MS - Ionização por Dessorção a Laser assistida por Matriz com Analisador do Tempo de Voo associado a Espectrometria de Massa

MCH - Hemoglobina corpuscular média

MCHC - Concentração de hemoglobina corpuscular média

MCV - Volume corpuscular médio

MGIT - Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias

MHE - Gelose Mueller-Hinton

MHF - Gelose Mueller-Hinton com adição de 5% de sangue

MO - Medula óssea

NAD - Nicotinamida adenina dinucleótido

NALC - N-acetil-L-cisteína

NaOH - Hidróxido de sódio

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PCR em tempo real - Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

PML-RARA - Promyocytic Leucemia-Retinoic Acid Receptor Alpha

PT - Tempo de protrombina

PVX - PolyViteX ou gelose de chocolate

RBC - Número de eritrócitos

RDW-CV - Coeficiente de variação da distribuição da amplitude dos eritrócitos

RIA - Radioimunoensaio

RIQAS - Randox International Quality Assessment Scheme
RNA - Ácido ribonucleico
Rpm - Rotações por minuto
RPR - Rapid Plasma Reagin
RT-PCR - Reação em Cadeia da Polimerase com transcriptase reversa
SCT - Tempo de coagulação com sílica
SGC - Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol
SMAC - MacConkey com sorbitol
SS - Gelose *Salmonella-Shigella*
TVVRd - Teste de veneno de víbora de Russell diluído
TSA - Testes de Suscetibilidade a Antibióticos
UK-NEQAS - United Kingdom National External Quality Assessment Service
VCAT 3 - Gelose de chocolate PolyViteX
vWF - Fator de von Willebrand

Resumo

O laboratório de Análises Clínicas tem um papel essencial no que toca à prevenção, diagnóstico e tratamento das mais diversas patologias. Tendo uma ação direta a nível individual, mas criando um grande impacto a nível da saúde comunitária.

O presente relatório aborda o estágio curricular realizado no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, que ocorreu no serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) entre o mês de janeiro e o mês de junho de 2021.

O documento engloba toda a componente teórica e prática apreendidas ao longo do estágio, servindo como complemento a toda a formação dada durante o curso. Aqui são abordadas as valências de Bioquímica e Imunologia e, em maior pormenor, Hematologia e Microbiologia.

Palavras-chave: Mestrado em Análises Clínicas; Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra; CHUC; Diagnóstico Laboratorial; Hematologia; Microbiologia.

Abstract

The Clinical Analysis laboratory plays an essential role in preventing, diagnosing, and treating the most diverse pathologies by taking direct action at individual level while creating a major impact on community health.

This report addresses the curricular internship held in the context of the Master's degree in Clinical Analysis of the Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra which occurred in the Clinical Pathology service of the Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) between January and June 2021.

The document encompasses all the theoretical and practical components applied throughout the internship, serving as a complement to all the training given during the course. It addresses the valences of Biochemistry and Immunology, and in greater detail, Hematology and Microbiology.

Keywords: Master's degree in Clinical Analysis; Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra; CHUC; Laboratory Diagnosis; Hematology; Microbiology.

I. Introdução

O laboratório de Análises Clínicas tem um papel essencial na avaliação da saúde da população, tendo impacto na prevenção, obtenção de diagnósticos e avaliação da evolução do tratamento. Para isso, existe a cooperação entre equipas multidisciplinares que atuam em diferentes valências sendo que a partir da interligação dos resultados obtidos pode-se chegar a uma conclusão relativa ao estado de saúde do paciente.

Para a realização de um diagnóstico definitivo é necessário incluir a anamnese, a história clínica (idade, sexo, histórico clínico, profissão, viagens recentes, patologias existentes) e avaliações laboratoriais. Na análise laboratorial são várias as amostras que podem ser colhidas, tais como sangue, urina, fezes, líquido cefalorraquidiano (LCR), amostras respiratórias, entre outras.

Na dinâmica do laboratório são estabelecidas três fases principais: a fase pré-analítica, analítica e pós-analítica. A fase pré-analítica inclui todo o processo desde a requisição do teste e preparação do paciente até à colheita, transporte/conservação e receção da amostra, estando esta fase associada a uma maior percentagem de erros. A fase analítica corresponde a todo o processamento da amostra, que atualmente evolui cada vez mais para técnicas automatizadas. Por fim, a fase pós-analítica que é onde há a obtenção dos resultados, a sua validação e o armazenamento ou eliminação adequados da amostra¹.

No âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra realizei o meu estágio com a duração de seis meses no serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) e, durante o qual, tive a orientação da Dra. Alice Mendes, da Dra. Cristiana Canha e da Professora Doutora Olga Cardoso. O estágio visou a consolidação dos conceitos teóricos apreendidos durante o Mestrado assim como a aquisição de competências práticas, de interpretação e validação nas valências de Bioquímica, Imunologia, Hematologia e Microbiologia. Para a realização deste relatório decidi abordar com maior detalhe as valências de Hematologia e Microbiologia.

2. Caracterização do Laboratório

O estágio foi realizado no serviço de Patologia Clínica do CHUC (inclui o Hospital da Universidade de Coimbra (HUC), Hospital Geral dos Covões (HG) e Hospital Pediátrico (HP)) que é dirigido pelo Dr. Fernando Rodrigues.

O laboratório localiza-se no edifício São Jerónimo e estruturalmente engloba:

- a área de colheitas, onde são colhidas amostras sanguíneas pelos Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica, e amostras de urina colhidas pelo utente;

- a zona do Core, onde é feita a receção e triagem de todas as amostras. Neste local existe uma cadeia que transporta as amostras de soro e sangue para os respetivos aparelhos de forma automatizada, que executam parâmetros das áreas de Bioquímica, Hematologia e Serologia. Esta metodologia permite a otimização de todo o processo de distribuição. Todas as amostras passam depois para os diferentes setores onde são executados procedimentos mais específicos e/ou manuais;

- vários setores, entre eles o setor da Serologia e avaliação urinária, setor da Autoimunidade, setor de Imunologia, setor da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), setor de Citogenética/Hibridização de Fluorescência *in situ* (FISH), setor de Endocrinologia, setor da Coagulação Especial, setor da Microbiologia (inclui sala de Bacteriologia, sala de Micologia, sala de Micobacteriologia e sala de microscopia) e respetivas salas de validação;

- a sala de lavagens e esterilização e salas de armazenamento de reagentes.

O sistema informático que suporta todo o laboratório é o Clinidata® XXI (MaxData) que permite fazer a triagem de todos os produtos colhidos, verificar exames pedidos, tirar listas de trabalho, rastrear amostras, validar e verificar resultados e, também, ver o histórico do paciente. Grande parte dos resultados obtidos são transmitidos diretamente do aparelho para o sistema informático, o que reduz a possibilidade de erro.

A equipa engloba diferentes profissionais que trabalham em sintonia, tais como médicos Patologistas Clínicos, Farmacêuticos, Técnicos Superiores de Saúde, Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica, Assistentes Operacionais e Assistentes Administrativos.

Grande parte dos produtos biológicos processados provêm da zona de colheitas do laboratório, podendo também ser recebidos dos serviços de Internamento ou do serviço de Urgência do CHUC. Para além destes, são recebidas amostras de outros Hospitais ou ainda de Centros de Saúde.

3. Controlo de Qualidade

A qualidade corresponde à capacidade de satisfação de requisitos e envolve a avaliação dos diferentes parâmetros laboratoriais tendo em conta a precisão, exatidão, custo, fiabilidade e tempo oportuno. O controlo de qualidade dá-nos a garantia da qualidade dos resultados obtidos.

A amostra do controlo de qualidade interno deve ter uma constituição e comportamento semelhantes às amostras dos doentes, valores próximos dos níveis de decisão clínica, apresentar baixa variabilidade, ser estável por longos períodos de tempo e ter baixos custos. Este muitas vezes vem incluído no *kit* juntamente com o respetivo valor, apresentando diferentes níveis (baixo, médio e alto ou positivo e negativo).

O controlo interno é feito todos os dias para garantir que o processo está controlado e permitir a validação dos nossos resultados. Para além disso, dá-nos informação relativa à reprodutibilidade do método e à precisão/variação das determinações.

Os valores obtidos são usados para desenhar a carta de Levey-Jennings que é interpretada pelas regras de Westgard, onde é possível observar a existência de erros aleatórios ou tendências. Sempre que o controlo não passar é necessário tomar uma ação e averiguar a possível causa do erro.

O controlo de qualidade externo corresponde a amostras acerca das quais o laboratório não possui qualquer informação, que são processadas como as amostras dos pacientes. Com base nas determinações efetuadas é redigido um documento que é enviado para o laboratório avaliador. Este, por sua vez, compara os resultados individuais e os obtidos por outros aparelhos e metodologias entre os laboratórios participantes e redige um relatório de apreciação da performance. O controlo externo permite-nos averiguar se estamos a trabalhar com exatidão.

São vários os programas de qualidade externa em que o laboratório do CHUC participa, como, por exemplo, o RIQAS ou o UK-NEQAS¹.

4. Hematologia

O laboratório de Hematologia realiza um conjunto de testes de rotina e outros mais diferenciados em diversos produtos como sangue total, medula óssea (MO) e líquidos biológicos (líquido sinovial, líquido pleural, líquido pericárdico ou líquido peritoneal).

O sangue é constituído pelos elementos figurados que se encontram em suspensão no plasma: eritrócitos, leucócitos e plaquetas. O processo de formação das células sanguíneas é designado hematopoiese e, no adulto, ocorre predominantemente ao nível da MO do esqueleto axial. A partir de células estaminais hematopoiéticas pluripotentes há a diferenciação para linhagem mielóide e linfóide que originam os diferentes percursos e respetivas células sanguíneas².

4.1 Hemocitometria

No setor de Hemocitometria as amostras de sangue são colhidas em tubos de EDTA K₃ que são distribuídos para analisadores automáticos incluídos numa cadeia de automação própria, a Sysmex XN-9000™ (Sysmex). Esta inclui quatro contadores hematológicos (três XN-10 e um XN-20), um módulo que realiza e cora esfregaços de sangue periférico (SP-10) e um módulo que digitaliza esses esfregaços, disponibilizando uma identificação presuntiva e agrupamento dos diferentes tipos celulares através de um software dedicado (DI-60).

Os contadores hematológicos permitem a determinação dos seguintes parâmetros: eritrócitos e respetivos índices, reticulócitos, eritroblastos, plaquetas, diferencial de leucócitos (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos), granulócitos imaturos e linfócitos atípicos, ativados ou blastos.

As determinações efetuadas pelos contadores utilizam diferentes metodologias. Para a avaliação dos eritrócitos e plaquetas é usada a impedância com focagem hidrodinâmica, que tem por base o princípio de Coulter. Nesta, a amostra diluída numa solução salina atravessa uma abertura onde existe um campo elétrico criado por dois eletrodos polarizados. A focagem hidrodinâmica permite direcionar o fluxo, fazendo com que passe apenas uma célula de cada vez. Esta passagem causa uma mudança na resistência elétrica e a impedância daí resultante é proporcional ao tamanho da célula. O impulso elétrico é depois convertido num histograma³.

A metodologia utilizada para a medição da hemoglobina é a espectrofotometria. Após a lise dos eritrócitos é adicionado lauril sulfato de sódio cuja porção hidrofóbica reage com a globina, expondo o grupo heme e oxidando o ião ferroso (Fe²⁺) a férrico (Fe³⁺). A porção hidrofílica liga-se depois ao ião férrico permitindo a medição do complexo formado a 555 nm⁴.

A contagem total e diferencial dos leucócitos é feita através de citometria de fluxo com fluorescência. Nesta metodologia células em suspensão alinhadas uma a uma passam através de um laser sofrendo dispersão da luz a diferentes ângulos. A medição da luz dispersa a nível frontal permite-nos avaliar o número e tamanho da célula. A luz dispersa a nível lateral permite avaliar a complexidade e conteúdo da célula, definidos em termos de granularidade e lobulação. Através da permeabilização das células e por adição de fluoró cromos específicos conseguimos distinguir as populações leucocitárias⁵.

O hemograma é avaliado automaticamente através de um conjunto complexo de regras multiparamétricas e, caso seja necessário, é feito automaticamente um esfregaço corado pela coloração de May-Grunwald-Giemsa, assim como a digitalização da zona adequada do esfregaço.

Apesar desta ser uma área bastante automatizada mantém a necessidade de averiguar possíveis fontes de erro, entre elas confirmar a identificação do paciente, verificar a presença de coágulos ou verificar a presença de aglutininas a frio. Este último envolve colocar o tubo do paciente a 37°C na estufa durante 30 minutos, homogeneizar e voltar a repetir o hemograma. Caso os valores sofram alteração, confirma a presença de autoanticorpos que, quando sujeitos a baixas temperaturas, provocam a aglutinação dos eritrócitos⁶.

O hemograma permite avaliar quantitativa e qualitativamente as populações celulares sanguíneas e é composto pelo eritrograma, leucograma e trombograma.

4.1.1 Eritrograma

Os eritrócitos são os elementos figurados predominantes no sangue e têm como principal função a realização das trocas gasosas com os tecidos. A sua formação é regulada pela eritropoietina, hormona produzida pelo rim, que é estimulada quando a pressão parcial de oxigénio nas células renais diminui⁷.

O eritrograma permite fazer a avaliação dos eritrócitos em termos de quantificação, conteúdo e tamanho, através da avaliação dos diferentes índices eritrocitário presentes na Tabela i⁸. Os intervalos de referência no CHUC são ajustados para o tipo de população do mesmo e em função dos dados demográficos.

Tabela i - Índices Eritrocitários

Parâmetro	Intervalo de referência	Interpretação	
Número de eritrócitos (RBC)	Homem- 4,5-5,9×10 ¹² /L; Mulher- 3,9-5,2 ×10 ¹² /L	Os três parâmetros (RBC, Hb e HCT) em associação permitem confirmar a presença de anemia. Variam com sexo e idade.	
Hemoglobina (Hb)	Homem- 13-17,5 g/dL; Mulher- 12-15,6 g/dL		Constituída por 4 cadeias de globina e 4 grupos heme (protoporfirina e átomo de ferro)
Hematócrito (HCT)	Homem- 41-53%; Mulher- 35,5-45,5%		Percentagem de eritrócitos no volume total de sangue após centrifugação
Volume Corpuscular Médio (MCV)	80-100 fl		Caracteriza o tamanho dos eritrócitos. Calculado através da divisão entre o volume ocupado pelos eritrócitos e o n.º total destes.

		Permite caracterizar os eritrócitos como microcíticos, normocíticos ou macrocíticos
Hemoglobina Corpuscular Média (MCH)	27-33,5 pg	Corresponde ao conteúdo de Hb em cada eritrócito Calculado através da divisão da Hb pelo RBC Permite caracterizar os eritrócitos como hipocrómicos ou normocrómicos
Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (MCHC)	31-37 g/dL	Corresponde ao volume ocupado pela Hb no volume total de eritrócitos Valor relativamente constante para o mesmo indivíduo
Coefficiente de Variação da Distribuição da Amplitude dos Eritrócitos (RDW-CV)	11,5-15%	Indica a variação de tamanhos dos eritrócitos (anisocitose)
Reticulócitos	0,5-2,5%	Permite avaliar a capacidade de resposta da MO perante uma situação de anemia

Para a caracterização da anemia podemos ter em atenção os sinais e sintomas clínicos, como a palidez, astenia ou taquicardia, em conjunto com a interpretação dos índices. Sendo que, para se proceder a um tratamento eficaz, é necessário primeiro identificar a causa.

Diferenciando as anemias com base no tamanho dos eritrócitos e conteúdo de hemoglobina, as causas mais comuns de anemia microcítica hipocrómica são:

- Deficiência de ferro/sideropenia - por aporte insuficiente na dieta ou associado a problemas de absorção intestinal. Nesta situação importa avaliar também as reservas de ferro através da ferritina, a capacidade total de ligação do ferro (TIBC) e a saturação da transferrina;
- Hemoglobinopatia quantitativa/talassémia - rastreio feito por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com avaliação das percentagens de hemoglobina (valores normais de 97% para Hb A, 2% para Hb A₂ e 1% para Hb F) e respetiva caracterização por eletroforese.

Algumas causas de anemias normocíticas normocrómicas são:

- Hemólise - pode ter origem auto-imune, microangiopática (confirmado pela presença de esquizócitos no esfregaço de sangue periférico), devido a anomalias na membrana plasmática ou ainda a alterações enzimáticas. Nas situações de suspeita de hemólise deve ser feita a avaliação da bilirrubina indireta, da haptoglobina, lactato desidrogenase (LDH) e contagem de reticulócitos;
- Anemia da doença crónica - verificar se outras enzimas inflamatórias também se encontram aumentadas, tais como ferritina ou proteína C reativa.

Uma causa comum de anemia macrocítica é:

- Megaloblástica - associada a ingestão deficitária ou a má absorção de vitamina B12. Neste caso deve-se dosear a vitamina B12 e o ácido fólico e pesquisar a presença de autoanticorpos contra o fator intrínseco ou células parietais. Na observação do esfregaço de sangue periférico, para além de macrócitos, é possível verificar a presença de neutrófilos hipersegmentados⁹.

4.1.2 Leucograma

Permite obter a contagem diferencial dos glóbulos brancos, células que fazem parte do Sistema Imune permitindo a defesa do organismo.

São divididos em polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e em mononucleares (linfócitos e monócitos). A Tabela ii apresenta o intervalo de referência do CHUC para os diferentes glóbulos brancos.

Tabela ii - Intervalos de referência de leucócitos

Parâmetro	Intervalo de referência
Leucócitos Totais	4,0-11,0 $\times 10^9/L$
Neutrófilos	2,5-7,5 $\times 10^9/L$
Linfócitos	1,5-3,5 $\times 10^9/L$
Monócitos	0,2-0,8 $\times 10^9/L$
Eosinófilos	0,04-0,4 $\times 10^9/L$
Basófilos	0,01-0,1 $\times 10^9/L$

A situação de leucocitose ou leucopenia corresponde ao aumento ou diminuição do número total de glóbulos brancos, respetivamente.

Distinguindo cada população leucocitária temos os neutrófilos com um núcleo constituído por três a cinco lóbulos e com grânulos finos (contém lisozima e mieloperoxidase) dispersos no seu citoplasma. Estes têm função fagocítica e de quimiotaxia.

Situações de neutrofilia podem ser devidas a infeções bacterianas (neste caso, os neutrófilos podem aparecer hipergranulares e com vacúolos), inflamação ou queimaduras. Já a neutropenia pode estar associada à presença de síndromas congénitos ou ser adquirida (medicamentos, doença auto-imune).

Os linfócitos têm um núcleo geralmente redondo e incluem dois tipos principais, os B e os T (imunidade adquirida). Os linfócitos B são produzidos na MO e têm a capacidade de se diferenciar em plasmócitos, que produzem imunoglobulinas (imunidade humoral). Já os linfócitos T são produzidos na MO, mas sofrem maturação no timo, tendo um papel importante na imunidade celular e ativação dos linfócitos B.

A linfocitose pode dever-se a infecções virais, alergias ou doença hemato-oncológica. Já a linfopenia pode advir de quimioterapia ou infecções virais (vírus da imunodeficiência humana (HIV)).

Os monócitos têm um núcleo em forma de rim e possuem um papel importante ao nível da fagocitose, transformando-se em macrófagos quando passam para os tecidos.

A monocitose pode ocorrer devido a doenças infecciosas causadas por vírus e fungos ou doença hemato-oncológica. Já a monocitopenia pode estar associada a medicamentos.

Os eosinófilos têm um núcleo geralmente composto por dois lóbulos e os grânulos (contêm peroxidase eosinofílica) apresentam uma cor mais alaranjada pela coloração de May-Grunwald-Giemsa.

A eosinofilia está associada a situações de infeção parasitária ou alergias e a eosinopenia está associada a toxicidade por medicamentos ou processos inflamatórios.

Os basófilos apresentam um núcleo com dois lóbulos e no seu citoplasma existem grânulos grosseiros (contêm heparina e histamina) que coram de roxo pela coloração de May-Grunwald-Giemsa.

A basofilia pode ser devida a doenças inflamatórias e a basopenia pode ser devida a gravidez ou situações de *stress*¹⁰.

As leucemias são, habitualmente, caracterizadas por um elevado número de leucócitos ou respetivos precursores a nível da MO e sangue periférico. Estas podem ser divididas em agudas ou crónicas, sendo que nas primeiras há um excesso de produção pela MO com um elevado número de células imaturas e a segunda é devida à acumulação de leucócitos maduros. As leucemias podem também ser classificadas como mieloblásticas, mais comuns em adultos, e linfoblásticas, mais comuns em crianças.

A sua etiologia é indeterminada, muitas vezes relacionada com anomalias genéticas, radiação ou exposição a químicos. Para o seu diagnóstico, para além do leucograma e observação do esfregaço sanguíneo, deve ser feita a associação a técnicas como a imunofenotipagem, citogenética e/ou hibridização de fluorescência *in situ*¹¹.

4.1.3 Trombograma

As plaquetas têm um papel ativo na hemostase e trombose, sendo a megacariopoiese regulada pela trombopoietina produzida pelo fígado. No interior das plaquetas existem três tipos de grânulos: denso, alfa e lisossomal. Estes contêm enzimas com ação hidrolítica e moléculas associadas ao processo de ativação plaquetar (cálcio, ATP e epinefrina).

O seu intervalo de referência oscila entre 150 a 400 $\times 10^9/L$. A trombocitopenia pode ocorrer devido a doenças auto-imunes ou infecções e a trombocitose pode estar associada a alterações ao nível da MO¹².

4.2 Velocidade de sedimentação (VS)

A velocidade de sedimentação é medida no aparelho Ves-Matic Cube 30 (Menarini Diagnostics) e baseia-se no método de Westergren, que inclui a formação do fenómeno de roleaux, seguido de precipitação e sedimentação dos glóbulos vermelhos¹³. Após a agitação do tubo de EDTA K₃ o aparelho faz medições de forma a verificar a diferença da distância de sedimentação dos eritrócitos durante 30 minutos. Esta é depois extrapolada para mm/hora. Os valores de VS num indivíduo normal são inferiores a 20 mm/h.

Num indivíduo saudável os eritrócitos carregados com carga negativa repelem-se uns aos outros. Quando há alteração da quantidade de proteínas no plasma, devido a estas terem carga positiva ocorre uma neutralização da carga dos eritrócitos e o fenómeno de roleaux acontece de forma mais acentuada¹⁴.

Esta é uma análise bastante requisitada, podendo ser utilizada em casos de monitorização de patologias auto-imunes, como a artrite reumatóide ou lúpus eritematoso sistémico (LES), e em patologias hematológicas, como o Mieloma Múltiplo. No entanto, é bastante inespecífica podendo estar aumentada em várias situações, tais como inflamação, infeção, doença hematológica ou gravidez¹³.

4.3 Hemostase

A hemostase corresponde ao processo fisiológico que permite a manutenção do fluxo de sangue dentro dos vasos sanguíneos aquando de uma lesão. Esta atua de modo a parar a hemorragia de forma autolimitada, englobando fatores procoagulantes e anticoagulantes.

Foram vários os modelos desenvolvidos para explicar o processo de hemostase, sendo o atual o modelo da coagulação baseado em superfícies celulares. Porém, a nível laboratorial, a avaliação dos parâmetros relacionados com a coagulação tem por base o modelo clássico. Este engloba três etapas principais, sendo elas a hemostase primária, hemostase secundária e fibrinólise (Figura 1).

A hemostase primária inclui o mecanismo de vasoconstrição que é obtido através da contração das células do músculo liso em associação com vasoconstritores, de modo a reduzir

o fluxo sanguíneo. O fator de von Willebrand (vWF) liga-se às plaquetas e estimula a sua adesão ao endotélio. A exposição destas a fatores como o colagénio inicia a ativação plaquetária, provocando a alteração da sua conformação, a libertação do conteúdo dos grânulos e a formação de agregados plaquetários.

A hemostase secundária, também designada de coagulação, permite a formação do coágulo de fibrina insolúvel. Numa fase inicial, o agregado de plaquetas serve de base para o início da cascata de coagulação, que engloba a via intrínseca e/ou a via extrínseca. A via intrínseca envolve a ativação pelo colagénio dos fatores de coagulação XII, XI, IX e VIII, e a via extrínseca envolve a ativação pelo fator tecidual do fator de coagulação VII. Estas convergem na via comum, onde o complexo protrombinase (fatores de coagulação X e V, cálcio e fosfolípidos) converte a protrombina em trombina, que por sua vez converte o fibrinogénio em fibrina. Por fim, existe a ação do fator XIII que estabiliza o coágulo¹⁵.

A fibrinólise corresponde à degradação enzimática do coágulo, permitindo restabelecer a função e integridade do vaso¹⁶.

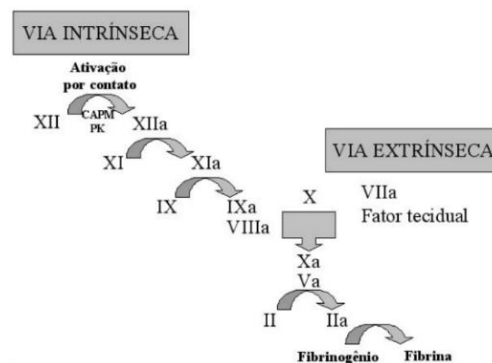


Figura 1 - Modelo Clássico da Cascata de Coagulação. Adaptado de ¹⁶ (Anexo I).

Na fase pré-analítica dos estudos de coagulação é importante ter em conta os seguintes fatores:

- Utilização de tubos de citrato com proporção de 1:9 de 3,2% citrato trissódico para sangue (aceitável variação de 10%);
- Em indivíduos com hematócrito superior a 55% é necessário fazer cálculos de ajuste para o anticoagulante;
- Só podem ser realizados testes até quatro horas após a colheita;
- Determinados testes de coagulação necessitam de dupla centrifugação de modo a obter-se plasma pobre em plaquetas, uma vez que estas podem ter interferência nos resultados;

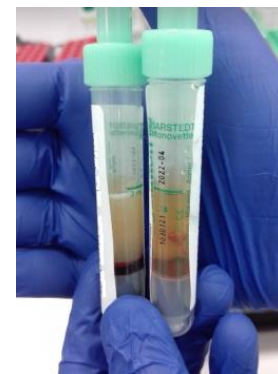


Figura 2 - Tubo lipémico do lado esquerdo e presença de coágulo no tubo do lado direito. Fotografia tirada no CHUC.

- Distinção entre antiagregante e anticoagulante. O primeiro evita a ativação e agregação plaquetária enquanto o segundo atua inibindo os fatores de coagulação;
- A introdução de erros pode ser devida ao uso do anticoagulante incorreto, volume incorreto de amostra e presença de coágulos, hemólise, icterícia ou lipémia (Figura 2)¹⁷.

O aparelho ACL TOP[®] 700 (Instrumentation Laboratory) determina diferentes parâmetros hemostáticos recorrendo a três metodologias diferentes: coagulométrica, cromogénica e imunológica. Para estas avaliações são utilizados tubos de citrato centrifugados a 3000 rpm durante 15 minutos.

4.3.1 Método Coagulométrico

Na presença de reagentes específicos para cada teste é adicionado cloreto de cálcio e, a partir dessa adição, é iniciada a medição do tempo necessário para a formação do coágulo, medido através de turbidimetria.

- Tempo de protrombina (PT)/ Rácio Internacional Normalizado (INR)

Permite a avaliação da eficiência da via extrínseca e via comum. Este mede, em segundos, o tempo que demora a ser formado o coágulo após a adição de tromboplastina (que inclui o fator tecidual e fosfolípidos). O intervalo de valores de referência usado no CHUC é entre 9,4 a 12,55 segundos.

De maneira a reduzir a variabilidade associada ao uso de diferentes tromboplastinas foi desenvolvido o INR, cujo valor normal varia entre 0,9 e 1,7 e que corresponde à seguinte equação (ISI-índice de sensibilidade internacional):

$$INR = \left[\frac{PT \text{ paciente}}{PT \text{ controlo}} \right]^{ISI}$$

O PT pode estar alterado devido a défice de fatores de coagulação, patologia hepática, deficiência de vitamina K, presença de inibidores ou anticoagulantes orais dependentes de vitamina K¹⁸.

- Tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT)

Permite a avaliação da eficiência da via intrínseca e via comum. Mede o tempo de coagulação após a ativação dos fatores de contacto, que incluem cefalina bovina e sílica. O intervalo de valores de referência usado no CHUC é entre 23,4 e 35,45 segundos.

O aPTT é utilizado para monitorização de terapia que usa heparina não fracionada, sendo um exemplo de gráfico obtido o da Figura 3.

Este pode estar alterado devido a deficiência de fatores (como na hemofilia), patologia hepática e presença de inibidores, de heparina, do inibidor tipo lúpus ou de anticoagulantes orais diretos, principalmente o dabigatrano^{18,19}.

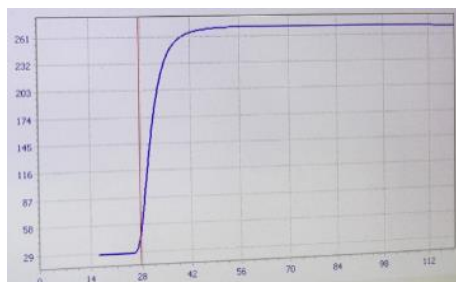


Figura 3 - Gráfico de aPTT onde se pode observar a fase de interação dos componentes, iniciação da coagulação e estabilização do coágulo. Fotografia tirada no CHUC.

- Fibrinogénio

Molécula sintetizada nos hepatócitos que circula no plasma numa concentração de 150-400 mg/dL. A técnica utiliza o método de Clauss, que se baseia na adição de uma quantidade de trombina em excesso e desta forma a conversão depende apenas da concentração do fibrinogénio presente. O valor determinado permite-nos encontrar patologias quantitativas, como afibrinogénemia ou hipofibrinogénemia, ou patologias qualitativas, como a disfibrinogénemia. As informações obtidas a partir deste teste podem ser avaliadas em associação com os tempos de trombina e reptilase¹⁸.

- Tempo de Trombina (TT)

É medido através da conversão de fibrinogénio em fibrina pela adição de trombina bovina purificada. O intervalo de referência varia entre 15 e 18 segundos e permite avaliar patologias relacionadas com o fibrinogénio¹⁷.

- Tempo de Reptilase (TR)

Realizado com base na atividade enzimática da batroxobina, uma enzima obtida a partir do veneno de serpente *Bothrops atrox*. Esta apresenta atividade semelhante à da trombina, clivando o fibrinogénio A em fibrinogénio. O intervalo de referência varia entre 18 e 22 segundos.

O que distingue o TT do TR é que este último não é afetado pela presença de heparina. Caso ambos se encontrem prolongados estamos na presença de patologias associadas ao fibrinogénio²⁰.

- Fatores de Coagulação

O doseamento individual dos fatores II, V, VII, VIII, IX, X, XI e XII permite confirmar o défice do fator e suspeitar de possíveis patologias associadas a esse défice. Por exemplo, um défice de fator VIII pode estar associado a hemofilia A ou doença de von Willebrand subtipo 2N^{21,22}.

O método envolve a adição de plasma deficitário no fator de interesse e a concentração do fator no plasma do doente é proporcional à correção do tempo de coagulação prolongado.

De forma a distinguir entre deficiência de fator ou presença de inibidor podem ainda ser realizados dois tipos de teste concomitantemente:

- Teste de Mistura

Adicionar plasma do doente, com o tempo de coagulação prolongado, a um plasma controlo. Voltar a determinar o aPTT e, caso o doente apresente o défice, o tempo de coagulação é corrigido. Caso exista um inibidor o tempo mantém-se prolongado.

O teste de mistura é avaliado através do índice de Rosner, seguindo a seguinte fórmula:

$$\text{Índice de Rosner: } \frac{\text{aPTT plasma da mistura} - \text{aPTT plasma controlo}}{\text{aPTT plasma do doente}} \times 100 (\%)$$

Se o valor for inferior a 12% é devido a uma deficiência do fator, se for superior a 15% é devido à presença do inibidor. Quando o valor se encontra entre 12 e 15% é uma situação duvidosa.

- Teste do Paralelismo

São feitas diluições sucessivas cada vez maiores do plasma do doente e é doseado o fator. No caso de haver um défice à medida que se dilui, a quantificação do fator é cada vez menor. Caso exista um inibidor à medida que se dilui, a percentagem de fator aumenta uma vez existe cada vez menos inibidor a atuar²³.

- Inibidor Tipo Lúpus (ITL)

O anticoagulante lúpico corresponde a autoanticorpos policlonais que atuam contra fosfolípidos. Quando se suspeita da sua presença por prolongamento do aPTT sem uma causa conhecida, utilizam-se dois parâmetros de avaliação: o teste de veneno de víbora de Russell diluído (TVVRd) e o tempo de coagulação com sílica (SCT).

Ambos envolvem um teste *screen* onde há uma baixa concentração de fosfolípidos o que faz com que o reagente seja altamente sensível ao ITL, apresentado um prolongamento no tempo de coagulação; e um teste confirmatório cujo reagente apresenta uma elevada concentração de fosfolípidos, o que neutraliza o ITL e encurta o tempo de coagulação. Com base nos valores obtidos é calculado um rácio para o TVVRd e para o SCT, bastando um deles

ser superior a 1,2 para indicar a presença do anticoagulante lúpico. Este tem significado clínico quando, após 12 semanas, se mantém positivo, estando então associado a elevado risco trombótico.

O ITL é muitas vezes feito em indivíduos que apresentam doenças autoimunes (LES, síndrome antifosfolípido) ou a nível pré-operatório, uma vez que a presença deste permite fazer a distinção entre risco trombótico e risco hemorrágico^{24,25}.

4.3.2 Método Imunológico

Utilização de uma suspensão de partículas de látex com anticorpos monoclonais específicos para o parâmetro em análise. Quanto maior o grau de aglutinação daí resultante menor a quantidade de luz transmitida, sendo esta em alguns casos proporcional e noutros inversamente proporcional à concentração de analito (turbidimetria).

- D-dímeros

Moléculas obtidas a partir da degradação da fibrina por ação da plasmina. Os D-dímeros apresentam um valor preditivo negativo para o fenómeno de tromboembolia pulmonar, ou seja, se o seu valor for baixo (inferior a 500 mg/dL) este pode ser excluído.

Estes podem estar elevados em numerosas situações, tais como estados inflamatórios, idade avançada, gravidez ou infeção por SARS-CoV-2²⁶.

- Fator XIII

Fator de coagulação que tem como função a estabilização do coágulo de fibrina insolúvel formado. Este não influencia o PT nem no aPTT²⁷.

- Anti Fator Plaquetar 4 (anti PF4)

A avaliação deste parâmetro permite distinguir a presença de trombocitopenia induzida por heparina (HIT). Nesta situação ocorre uma ativação e agregação plaquetária mediada por anticorpos IgG que reconhecem o complexo formado pelo fator plaquetar 4 associado à heparina. Isto leva a um consumo das plaquetas num período entre cinco e dez dias após o início da toma do anticoagulante. Quando confirmado, o anticoagulante deve ser suspenso de imediato e substituído por outro.

Como apenas uma baixa percentagem de indivíduos a quem é administrada heparina desenvolve HIT, a sua avaliação não deve ser rotineira. Pelo que primeiro se realiza um teste de *screening* por *lateral flow assay* STic Expert[®] HIT (Stago) (Figura 4) e caso este seja positivo, passa-se para o doseamento dos anticorpos^{28,29}.

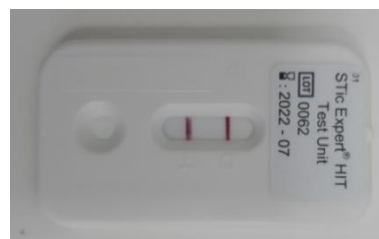


Figura 4 - Teste de *screening* STic Expert[®] HIT (Stago). Fotografia tirada no CHUC.

4.3.3 Método cromogénico

É adicionado um substrato cromogénico específico que sofre ação enzimática do analito de interesse, com consequente libertação de para-nitroanilina. A sua absorvância é medida a 405 nm e é inversamente proporcional à quantidade de analito.

- Anti Xa

A sua avaliação permite monitorizar e ajustar a dose de heparina não fracionada.

O mecanismo de atuação da heparina ocorre a nível da inativação do fator Xa e da trombina, uma vez que estimula a antitrombina III, evitando o processo de coagulação.

Neste caso, é feita a determinação do fator Xa residual que não ligou à heparina disponível³⁰.

4.4 Tromboelastometria rotacional

Teste viscoelástico realizado no aparelho ROTEM® (Sigma) que permite avaliar a formação, estabilização e degradação do coágulo em tempo real, mimetizando o processo de coagulação *in vivo*. Este é bastante utilizado em situações de hemorragia maciça aguda, em pacientes com COVID-19 ou durante transplantes.

Utilizando sangue total em tubo de citrato (não centrifugado) é feita a avaliação de quatro parâmetros em simultâneo: Intem, Extem, Fibtem e Aptem. O seu processamento faz uso de um suporte com compartimentos que possuem um pino suspenso com a capacidade de oscilar e à medida que se forma o coágulo vai sendo encontrada uma resistência a essa oscilação. O perfil resultante é visto em termos de amplitude (em milímetros) em função do tempo (em segundos), como observado na Figura 5.

Referindo cada parâmetro individualmente, o Intem avalia a via intrínseca e via comum, sendo sensível à presença de heparina. O Extem avalia a via extrínseca e via comum. O Fibtem avalia apenas a contribuição do fibrinogénio para a formação do coágulo, uma vez que há a inibição da ação plaquetária. O Heptem neutraliza a ação da heparina através da adição de heparinase e é comparado com o Intem. O Aptem permite verificar a presença de hiperfibrinólise e é comparável ao Extem.

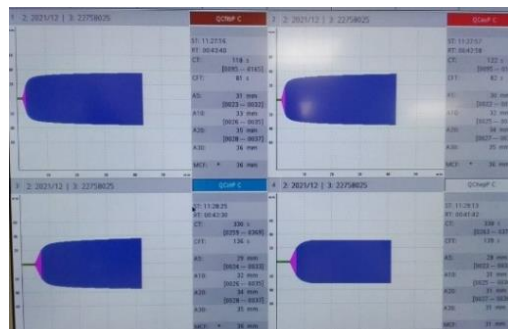


Figura 5 - Tromboelastometria rotacional. Inclui os parâmetros Intem, Extem, Fibtem e Aptem. Fotografia tirada no CHUC.

Este teste permite-nos diferenciar e verificar se estamos perante uma deficiência de fibrinogénio ou de outro fator de coagulação, hiperfibrinólise, trombocitopenia ou ainda detetar a presença de heparina³¹.

5. Citogenética

A Citogenética envolve o estudo dos cromossomas e a identificação de alterações numéricas ou estruturais destes.

No CHUC a citogenética convencional é direcionada para o diagnóstico hematológico de patologias como leucemias, neoplasias, síndromas mielodisplásicos ou mieloproliferativos, entre outros. Esta tem como principal objetivo auxiliar no diagnóstico, no prognóstico e orientar a terapêutica/avaliar a evolução do tratamento.

O cariótipo humano é constituído por um conjunto de 23 pares de cromossomas que são classificados através do tamanho, padrão das bandas e posição do centrómero, sendo representados através do cariograma.

As amostras tipicamente utilizadas são a MO, colhida em tubo de heparina lítio, ou sangue periférico, quando o número de células blásticas neste é superior a 20%. A partir destes produtos biológicos são feitas culturas de forma a permitir a proliferação de células precursoras, como blastos, promielócitos ou mielócitos.

As culturas são realizadas em meio MarrowMAX™ (TermoFisher Scientific) ao qual são adicionados metotrexato ou timidina, agentes citostáticos, que bloqueiam a síntese dos ácidos nucleicos permitindo sincronizar as células na interfase. Posteriormente é adicionado *Colcemid* que inibe a polimerização do fuso acromático, mantendo as células na metafase. Com recurso a uma solução hipotónica causamos a lise da membrana celular com dispersão dos cromossomas. É depois adicionada a solução de Carnoy (3:1 de metanol para ácido acético) que funciona como fixador, permitindo o espalhamento dos cromossomas sobre a lâmina (temperatura de 30°C, humidade superior a 35%).

Para uma melhor distinção dos cromossomas são utilizadas técnicas de bandeamento, como as bandas G. Nesta os cromossomas sofrem ação da tripsina, que se intercala entre as bases do ácido desoxirribonucleico (DNA) lisando parcialmente o material genético que é, de seguida, corado com Giemsa. As regiões do cromossoma mais claras são ricas em guanina e citosina (zonas mais ativas transcricionalmente) e as mais escuras são ricas em timina e adenina (zonas pobres em genes).

Para se proceder à identificação dos cromossomas e fazer o respetivo cariótipo é utilizado o programa IKAROS. Através do cariótipo podemos observar a presença de alterações numéricas, como monossomia ou trissomia, ou alterações estruturais, como translocações ou deleções. O diagnóstico é feito com base na observação de pelo menos 20 metafases com a mesma alteração³².

6. Hibridização de fluorescência *in situ* (FISH)

Técnica de citogenética molecular que permite a pesquisa de sequências de DNA, apresentando elevada resolução, sensibilidade e especificidade. Esta utiliza células na interfase, mas também pode excluir os falsos positivos provenientes da avaliação do cariótipo em metafases³³.

Primeiramente é feita imunofenotipagem (não tive oportunidade de ver pois é feita no HG) de forma a separar as células do clone oncológico e depois é realizado o FISH (Figura 6).

O FISH envolve a desnaturação dos cromossomas de forma a ligarem-se a sondas marcadas com fluoróculo específicas do local de interesse, ocorrendo hibridização e emissão de fluorescência.

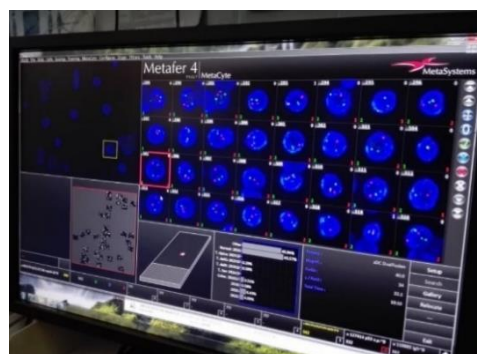


Figura 6 - Imagens obtidas a partir da técnica de FISH utilizando uma sonda de fusão. Fotografia tirada no CHUC.

Existem diferentes tipos de sondas, sendo as mais comuns as centroméricas, as específicas de locus ou o pintado cromossómico (permite distinguir todo o cromossoma ou apenas regiões deste). Estas são ainda classificadas em:

- sondas de enumeração, que permitem através da contagem do número de sinais avaliar o número de cópias do gene presentes;
- sondas de fusão, que determinam zonas de translocação entre duas regiões cromossómicas. Quando existe uma translocação em vez de serem observados os quatro sinais correspondentes ao par de homólogos, verificamos que em dois cromossomas estes se encontram extremamente próximos dando origem a apenas um sinal de fusão;
- sondas de rearranjo, nas quais marcamos a região proximal e distal à região de interesse e, caso haja alguma alteração, estes apresentam-se separados. Esta é bastante utilizada quando se suspeita da existência de vários cromossomas envolvidos.

O FISH apresenta-se como uma técnica mais rápida e complementar à citogenética convencional³².

7. Caso Clínico de Hematologia

Indivíduo do sexo feminino de 54 anos deu entrada no serviço de Urgência devido a apresentar sintomas como fraqueza, febre e presença de equimoses nos membros inferiores. O exame físico permitiu confirmar a presença das equimoses a nível das pálpebras e membros inferiores e ainda a existência de petéquias nos membros inferiores. Foram então pedidos exames laboratoriais a nível hematológico e hemostático.

O hemograma com leucograma apresentava os valores presentes na Tabela iii.

Tabela iii - Hemograma do Caso Clínico de Hematologia

Parâmetro	Resultado	Unidades	Intervalo de referência/ Porcentagem determinada
RBC	1,2	$\times 10^{12}/L$	3,9-5,2
Hb	4,4	g/dL	12,0-15,6
HCT	12,5	%	35,5-45,5
MCV	104,2	fL	80-100
MCH	36,7	pg	27-33,5
MCHC	35,2	g/dL	31-37
RDW-CV	15,7		11,5-15,0
Eritroblastos	0,5	/100 leucócitos	
Reticulócitos	16	$\times 10^9/L$	25-105
Fração de reticulócitos imaturos	13	%	
Índice de produção de reticulócitos	0,14	<2: anemia com eritropoiese insuficiente	
Leucócitos	25,5	$\times 10^9/L$	3,90-10,2
Neutrófilos	0,1	$\times 10^3/\mu L$	0,5%
Linfócitos	5,7	$\times 10^3/\mu L$	22,2%
Monócitos	0	$\times 10^3/\mu L$	0%
Eosinófilos	0	$\times 10^3/\mu L$	0%
Basófilos	0	$\times 10^3/\mu L$	0%
Promielócitos	0,5	$\times 10^3/\mu L$	2,0%
Mielócitos	0,7	$\times 10^3/\mu L$	2,6%
Metamielócitos	0,5	$\times 10^3/\mu L$	2,0%
Outras células	17,9	$\times 10^3/\mu L$	70,2%
Plaquetas	16	$\times 10^9/L$	150-400

A partir dos dados podemos averiguar que a paciente apresentava trombocitopenia, anemia hiporregenerativa macrocítica hiperocrômica e linfocitose.

Pela observação do esfregaço de sangue periférico foi possível confirmar que os 70,2% das “Outras células” correspondem a células imaturas sugestivas de blastos. A série branca apresentava-se hiperleucocitária e os blastos existentes apresentavam-se grandes, granulares, alguns bilobados e com ramalhetes de bastonetes de Auer, sendo sugestivos de promielócitos (Figura 7). Era também perceptível a trombocitopenia a nível da série de trombócitos. Podia, portanto, suspeitar-se de uma Leucemia Promielocítica.



Figura 7 - A - Célula sugestiva de promielócito onde se observa o núcleo bilobado e os ramalhetes de bastonetes de Auer (faggot cell). Imagem obtida no CHUC. B - Célula sugestiva de promielócito hipergranular. Imagem obtida no CHUC.

Por imunofenotipagem foi confirmada a presença de 95% de blastos de linhagem mielóide no sangue periférico, característico de Leucemia Promielocítica Aguda.

Quando se suspeita de Leucemia Promielocítica são sempre pedidas quatro provas hemostáticas, entre elas o PT, aPTT, fibrinogénio e D-dímeros (Tabela iv).

Tabela iv - Parâmetros da coagulação do Caso Clínico de Hematologia

Parâmetro	Resultado	Unidades	Intervalo de referência
PT	16,0	segundos	9,4-12,5
INR	1,38		0,9-1,7
aPTT	24,1	segundos	23,4-35,4
Fibrinogénio	178,0	mg/dL	200-500
D-dímeros	17162	ng/mL	<230

O PT encontrava-se prolongado, sendo comum nestas situações o aPTT estar normal ou até encurtado, uma vez que a coagulação pode estar pré-ativada. Nas Leucemias Promielocíticas ocorre uma coagulopatia de consumo associada a um elevado risco

hemorrágico e é característico o fibrinogénio estar muito reduzido e os D-dímeros muito elevados³⁴.

Através da realização do cariótipo da paciente foi possível observar-se um excesso de banda no cromossoma 15 e uma falta de banda no cromossoma 17, o que caracteriza a translocação $t(15;17)$ (Figura 8 A).

A técnica do FISH permitiu suportar os resultados obtidos através da Citogenética. Utilizando uma sonda de fusão LSI $t(15;17)$ PML/RARA Dual Color Dual Fusion conseguimos verificar a presença de dois sinais de fusão (Figura 8 B).

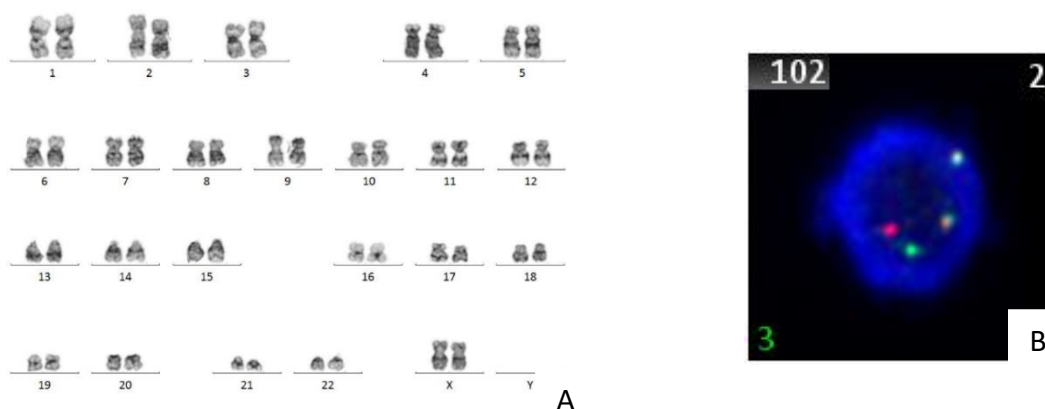


Figura 8 - A - Cariótipo com $t(15;17)$. Imagem obtida no CHUC. B - Imagem de FISH utilizando a sonda de fusão LSI $t(15;17)$ PML/RARA Dual Color Dual Fusion. Imagem obtida no CHUC.

Através da Biologia Molecular por Reação em Cadeia da Polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR) foi possível confirmar a presença do transcrito do gene de fusão PML-RARA subtipo bcr2 típico de Leucemia Promielocítica. Basta detetar a presença do transcrito para fazer logo o diagnóstico da patologia.

O diagnóstico definitivo foi de Leucemia Promielocítica Aguda, com necessidade de atuação imediata.

A Leucemia Promielocítica é uma Leucemia Mielóide Aguda caracterizada pela produção contínua pela MO de células precursoras da linhagem mielóide, devido a um bloqueio ao nível da diferenciação. Os sinais e sintomas mais comuns associados são fadiga, fraqueza devido à anemia, hemorragias (secundárias à trombocitopenia e coagulopatia de consumo) e febre (associada à leucopenia e aumento do risco infeccioso).

A nível genético é caracterizada pela presença da translocação recíproca $t(15;17)$ correspondente ao gene de fusão PML-RARA. A presença desta mutação afeta a ativação da

transcrição de genes implicados na granulopoiese, o nível do crescimento celular e a regulação da apoptose³⁵.

Esta leucemia é considerada uma emergência hematológica na qual se deve administrar de imediato isotretinoína e/ou trióxido de arsénio, caso contrário o paciente pode morrer por coagulopatia. O conteúdo dos grânulos libertado pelos promielócitos corresponde a moléculas de ação procoagulantes que podem originar Coagulação Intravascular Disseminada (CID). A administração dos diferenciadores atua no sentido de estimular a diferenciação promielocítica³⁶.

8. Microbiologia

A valência de Microbiologia no CHUC engloba diferentes áreas, entre elas a Bacteriologia, a Micologia, a Parasitologia, a Micobacteriologia, a Serologia, a Biologia Molecular e a Virologia.

O principal objetivo da Microbiologia é conseguir isolar, identificar e, caso seja possível, realizar o antibiograma do agente infeccioso responsável pela infeção de modo a poder ser iniciada uma terapêutica dirigida.

A colheita da amostra deve ser sempre regida por variados princípios, tais como a obtenção da amostra do local mais indicado para a pesquisa do microrganismo de interesse, envolver todas as condições de assepsia necessárias de modo a diminuir possíveis contaminações com a microbiota da região e, preferencialmente, antes de se iniciar antibioterapia.

Quando as amostras chegam ao laboratório são triadas e integradas no sistema informático Clinidata[®] e, aquando da sua receção, é importante ter em conta o seguinte:

- identificação correta;
- contentor adequado;
- frasco bem fechado e selado ou, no caso de zaragatoas, se vêm com o respetivo meio de transporte;
- volume suficiente para os testes a realizar;
- condições de transporte e conservação (tempo desde a colheita, temperatura).

Se estes parâmetros não se verificarem devemos rejeitar a amostra e pedir nova colheita, uma vez que os resultados obtidos podem ficar comprometidos³⁷.

De seguida, as amostras são direcionadas para as respetivas seções de acordo com os pedidos efetuados.

8.1 Bacteriologia

Bactérias são organismos procariotas unicelulares que se apresentam isolados ou em agrupamentos podendo englobar diversas morfologias, tais como cocos, bacilos ou espiroquetas.

Estas assumem vários papéis na sua interação com o ser humano e são consideradas comensais quando fazem parte da microbiota do organismo, como por exemplo a microbiota do trato gastrointestinal. No entanto, podem apresentar-se como oportunistas em situações esporádicas estimuladas por fatores como imunodepressão, idade ou tipo de dieta, tornando-se assim responsáveis pela infecção. Para além disso, existem bactérias patogénicas que têm a capacidade de causar sempre infecção.

Algumas possuem mecanismos de virulência que facilitam a infecção do hospedeiro, como, por exemplo, a presença de cápsula ou a produção de toxinas.

Outra forma de caracterização é o mecanismo de respiração, existindo bactérias aeróbias obrigatórias (*Pseudomonas aeruginosa*), anaeróbias facultativas e anaeróbias estritas (*Clostridium spp*)³⁸.

No laboratório de Bacteriologia são realizados os seguintes procedimentos:

8.1.1 Exame direto por coloração de Gram

O exame direto corresponde à realização de um esfregaço em lâmina feito diretamente a partir da amostra, corado pela coloração de Gram. Este é realizado para todo o tipo de produtos biológicos, exceto urina e fezes.

A coloração de Gram (Anexo 2) diferencia as bactérias de acordo com o tipo de parede celular. As bactérias de Gram positivo apresentam uma densa camada de peptidoglicano e coram de roxo, já bactérias de Gram negativo apresentam uma fina camada de peptidoglicano e uma membrana externa e coram de rosa³⁹.

Para orientar o processo de recuperação do microrganismo responsável é bastante importante a observação do exame direto que permite uma avaliação da amostra e, caso necessário, acrescentar meios de cultura aos pré-estabelecidos. Podendo também, em alguns casos, orientar para uma terapêutica empírica.

A observação microscópica do esfregaço é feita utilizando a objetiva de 50X e de 100X e permite verificar o tipo de microrganismo presente (bactéria, fungo, parasita), as características morfológicas apresentadas (forma, tamanho, cor) e a sua predominância. Para além disso, dá-nos informação acerca da existência de células epiteliais ou leucócitos.

8.1.2 Exame cultural

Os meios de cultura servem para a inoculação dos produtos biológicos e suportam o crescimento do microrganismo de interesse. Corresponde a um substrato rico em nutrientes que pode incluir tampões, indicador de pH, fatores de crescimento ou inibidores, fontes de carbono e azoto, sais minerais, vitaminas e aminoácidos.

Podemos encontrar diferentes tipos de meio no laboratório:

- meio de enriquecimento, que permite o crescimento da maioria dos microrganismos;
- meio de isolamento seletivo, que inibe o crescimento de determinado microrganismo, por exemplo através da adição de antibióticos;
- meio diferencial, que permite distinguir os microrganismos presentes através das respetivas características metabólicas e enzimáticas, auxiliando na sua identificação⁴⁰.

Na Tabela v estão descritos os meios utilizados no laboratório do CHUC para isolamento dos microrganismos de interesse.

Tabela v - Meios de cultura utilizados no laboratório de Microbiologia do CHUC

Meios de cultura	Características
Gelose de sangue (GS)	Meio de <u>enriquecimento</u> constituído por sangue de carneiro, que permite a observação do fenómeno de hemólise: <ul style="list-style-type: none">▪ β hemólise - hemólise total (<i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Streptococcus agalactiae</i>);▪ α hemólise - hemólise parcial (<i>Enterococcus faecium</i>, <i>Streptococcus pneumoniae</i>);▪ γ hemólise - não realiza hemólise (<i>Enterococcus faecalis</i>)⁴¹.
PolyViteX ou Gelose de chocolate (PVX)	Meio de <u>enriquecimento</u> utilizado para o crescimento de microrganismos fastidiosos, como <i>Haemophilus</i> spp. ou <i>Neisseria</i> spp. O meio é constituído por sangue de bovino cozido a 80°C, o que leva à hemólise dos eritrócitos e libertação do seu conteúdo, nomeadamente fator V (NAD) e fator X (hemina) ^{42,43} .
Gelose Cistina-Lactose-Deficiente em eletrólitos (CLED)	Meio <u>diferencial</u> usado para isolamento e semi-quantificação de uroculturas. Permite o crescimento de todos os microrganismos, inibindo o <i>swarming</i> do <i>Proteus</i> spp. devido ao baixo nível de eletrólitos. A cistina é adicionada de modo a facilitar o crescimento de coliformes (<i>Escherichia</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp. e <i>Klebsiella</i> spp.). A lactose no meio permite diferenciar fermentadores (meio adquire coloração amarela) de não fermentadores (meio fica azul devido ao indicador de pH azul de bromotimol) ⁴² .
MacConkey com sorbitol (SMAC)	Meio <u>seletivo</u> e <u>diferencial</u> utilizado para distinguir a bactéria <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica do serótipo O157:H7 responsável por gastroenterites e, em situações mais graves, pelo Síndrome Hemolítico-Urémico. Esta não tem a capacidade de fermentar o sorbitol e apresenta-se incolor no meio de cultura. A seletividade é dada pelos sais biliares e cristal violeta que impedem o crescimento de bactérias de Gram positivo ⁴⁴ .

Gelose Salmonella-Shigella (SS)

Meio seletivo e diferencial para pesquisa de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. em coproculturas. Os sais biliares, citrato de sódio e verde brilhante têm como função inibir o crescimento de bactérias de Gram positivo e coliformes. A lactose permite distinguir os fermentadores (colônias rosas) de não fermentadores (colônias incolores), que é o caso das duas bactérias de interesse. A presença de tiosulfato de sódio e citrato férrico permite evidenciar a produção de ácido sulfídrico correspondente a colônias de centro negro (típico de *Salmonella* spp.)⁴².

Gelose Hektoen (HEKT)

Meio seletivo e diferencial para pesquisa de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. em coproculturas. Sais biliares e fucsina ácida inibem as bactérias de Gram positivo e coliformes. Composto por três açúcares, o que permite distinguir os fermentadores e fermentadores tardios, que produzem colônias amareladas, dos não fermentadores, cujas colônias são esverdeadas/azuladas (caso das bactérias de interesse). O hipossulfito de sódio e o citrato de ferro amoniacal permitem evidenciar a produção de ácido sulfídrico correspondente a colônias de centro negro (típico de *Salmonella* spp.)⁴³.

Gelose Chocolate Haemophilus (HAE)

Meio seletivo para o isolamento de *Haemophilus* spp. a partir de amostras com microbiota rica (trato respiratório). Meio composto pelos fatores V e X e antibióticos e antifúngicos para a inibição de bactérias de Gram positivo e fungos⁴⁵.

Gelose Columbia ANC + 5% sangue de carneiro (CNA)

Meio seletivo para isolamento de bactérias de Gram positivo através da presença de antibióticos (ácido nalidíxico e colistina) que inibem bactérias de Gram negativo. Permite verificar os tipos de hemólise produzidos⁴³.

Gelose Yersinia (CIN)

Meio seletivo para o isolamento de *Yersinia* spp.. O meio é constituído por antibióticos (cefsulodina, irgasan e novobiocina), ácidos biliares e cristal violeta de forma a inibir a maioria das bactérias tanto de Gram positivo como negativo. O manitol e vermelho neutro dão uma coloração vermelha às colônias de *Yersinia* spp.⁴³.

Gelose Campyloset (CAM)

Meio seletivo para isolamento de *Campylobacter* spp. em coproculturas. Contém antibióticos e antifúngicos que inibem a maioria das bactérias de Gram positivo, Gram negativo e fungos⁴³.

Gelose para Burkholderia cepacia (BCSA)

Meio seletivo e diferencial para o isolamento de *Burkholderia cepacia*. Contém cristal violeta e antibióticos que inibem a maioria da microbiota respiratória. Colônias de *Burkholderia cepacia* apresentam-se amarelas neste meio⁴⁶.

Gelose de chocolate PolyViteX (VCAT 3)

Meio seletivo e de enriquecimento para o isolamento das espécies *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*. Inclui na sua composição uma base nutritiva enriquecida e um conjunto de antibióticos e antifúngicos, nomeadamente vancomicina, colistina, anfotericina e trimetoprim⁴³.

Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol (SGC)

Meio seletivo, com um pH ácido de 6,8, que favorece o crescimento e isolamento de fungos⁴⁷.

**Gelose Mueller-Hinton
(MHE)**

Meio utilizado na realização de testes de suscetibilidade a antibióticos (TSA). Permite o crescimento da maioria dos microrganismos, não contendo inibidores da ação dos antibióticos⁴².

Existem cinco tipos principais de sementeira feitas para os meios de cultura sólidos. A sementeira de semi-quantificação para amostras de urina, onde utilizando uma ansa calibrada de 1 µL se faz uma estria radial e de seguida estrias estreitas ao longo de toda a placa. A sementeira em toalha, utilizada em antibiogramas de forma a cobrir uniformemente todo o meio de cultura. A sementeira por inundação, realizada para o LCR, na qual se utiliza uma pipeta para colocar gotas do líquido biológico sobre o meio de cultura. A sementeira por rolamento, utilizada para cateteres ou drenos que são colocados sobre o meio de cultura e rolados em toda a sua extensão. E, por fim, a sementeira por esgotamento, realizada para os restantes produtos biológicos utilizando uma ansa de 10 µL. O objetivo desta última sementeira é esgotar o inóculo de forma a conseguir obter colónias isoladas^{43,48}.

São várias as condições ambientais necessárias para potenciar o crescimento bacteriano, tais como temperatura, tempo de incubação e atmosfera. Portanto, a seguir à realização da sementeira mais apropriada ao tipo de produto biológico e da inoculação nos meios de cultura pré-estabelecidos, a grande maioria dos meios é incubada numa estufa a 37°C, por um período de 18 a 24 horas e atmosfera capnófila (cerca de 6% de CO₂). As exceções são o meio CAM que é incubado a uma temperatura de 42°C, por um período de 48 horas a 72 horas numa atmosfera de microaerofilia (5% de O₂, 10% CO₂, 85% N₂), e os meios de cultura semeados a partir da urina e fezes que são colocados a 37°C, durante 18 a 24 horas numa estufa de atmosfera normal^{43,49}.

Após o período de incubação os meios são avaliados macroscopicamente e é averiguada a necessidade de prolongar o tempo de incubação ou repicar para outros meios de cultura para isolamento. A observação macroscópica das colónias ajuda na sua distinção, pois fenotipicamente estas podem apresentar diferenças a nível morfológico (tamanho, coloração, forma, bordos, superfície). Alguns exemplos observados durante o estágio são apresentados na Figura 9.

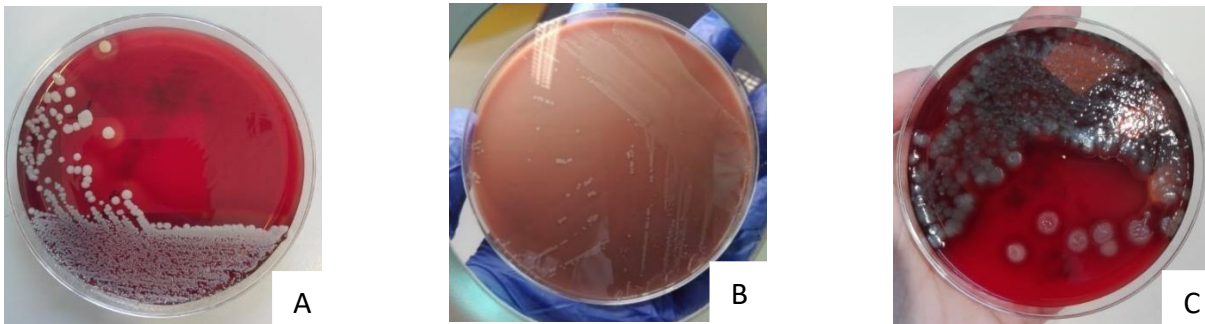


Figura 9 - A - Placa de GS com *S. aureus* isolado apresentando colônias brancas/amareladas, com bordos bem definidos, brilhantes. Também é possível observar a β hemólise. Fotografia tirada no CHUC. B - Placa de PVX com *Haemophilus* spp. isolado apresentando colônias pequenas, translúcidas e lisas. Fotografia tirada no CHUC. C - Placa de GS com *Pseudomonas aeruginosa* apresentando colônias planas, com brilho metálico, cheiro característico e que realizam β hemólise. Fotografia tirada no CHUC.

O cultivo em caldos de enriquecimento visa maximizar a recuperação do microrganismo de interesse. A indicação da presença de crescimento bacteriano é dada através da turvação ou pela produção de gás⁴⁹.

Em relação ao caldo de bacilos Gram negativo este é repicado para os meios SS e HEKT após 18 a 24 horas. Os restantes caldos são mantidos na estufa ou repicados para os meios de acordo com a suspeita caso apresentem turvação após as 18 a 24 horas.

Os caldos de enriquecimento utilizados no laboratório do CHUC estão descritos na Tabela vi.

Tabela vi - Caldos de enriquecimento utilizados no laboratório de Microbiologia do CHUC

Caldos de Enriquecimento	Características
Caldo de bacilos Gram negativo	Caldo de enriquecimento seletivo para <i>Salmonella</i> spp. e <i>Shigella</i> spp. que inclui na sua constituição citrato, desoxicolato e manitol. Este favorece o crescimento das bactérias de interesse que têm a capacidade de fermentar o manitol, limitando o crescimento de coliformes e <i>Proteus</i> spp. ⁵⁰ .
Brain Heart Infusion (BHI)	Caldo adaptado ao crescimento de microrganismos fastidiosos ou não fastidiosos, aeróbios ou anaeróbios, funcionando como um meio enriquecido com constituintes de cérebro e coração, peptonas e glicose ⁴² .
Cooked-Meat (CM)	Caldo de enriquecimento constituído por tecido muscular, principalmente utilizado para a obtenção de bactérias anaeróbias obrigatórias esporuladas ou não esporuladas ⁵¹ .

8.1.3 Exame direto a fresco

Engloba a colocação de uma gota de soro fisiológico ou água destilada numa lâmina, a suspensão da colónia de interesse sobre esta e a observação ao microscópio na objetiva de 40X. Este é um exame que ajuda a diferenciar rapidamente leveduras, cocos ou bacilos⁴⁹.

8.1.4 Identificação do microrganismo

O aparelho de identificação MALDI Biotyper™ smart (Bruker Daltonics Inc.) utiliza a técnica de Maldi-TOF-MS, Ionização por Dessorção a Laser assistida por Matriz com Analisador do Tempo de Voo associado a Espectrometria de Massa. Neste é colocada uma matriz juntamente com a colónia de interesse e ocorre o processo de liofilização do microrganismo. De seguida, recorrendo a lasers, é provocada a ionização das proteínas e os iões são acelerados por um campo elétrico ao longo de uma câmara de vácuo. Estes chegam ao detetor de acordo com a respetiva massa e carga formando um espectro específico do microrganismo. O espectro é depois comparado com uma base de dados permitindo a identificação do microrganismo⁵².

8.1.5 Teste de suscetibilidade aos antibióticos (TSA)

O antibiograma pode ser efetuado por sistemas automáticos, com recurso ao aparelho MicroScan WalkAway DxM 1096 (Beckman Coulter), ou de forma manual. Para a sua realização é necessário ter colónias puras inoculadas em meio GS ou CLED.

O TSA automático permite a incubação a 37°C, a leitura e a interpretação de cartas de antibióticos com base nas normas estabelecidas pelo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Este utiliza o método quantitativo de microdiluição em caldo, cujos poços apresentam diluições em série dos antibióticos a testar. Através de turbidimetria é avaliado o crescimento do microrganismo de interesse e este é considerado como sensível (microrganismo inibido pela presença do antibiótico), intermédio (microrganismo sensível com aumento da dose) ou resistente (microrganismo não é inibido pelo antibiótico). A concentração mínima inibitória (CIM) corresponde à concentração mais baixa de antibiótico necessária para inibir o crescimento visível do microrganismo.

Para o antibiograma manual é utilizado o método de difusão em disco, com base na técnica de Kirby-Bauer, ou o E-test. Em ambos os casos, utilizando a técnica de sementeira em toalha, é inoculado o meio de referência MHE com um inóculo de densidade 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ células/mL). No caso de microrganismos fastidiosos pode ser utilizada uma gelose Mueller-Hinton com adição de 5% de sangue (MHF). Os meios de cultura são depois incubados

a uma temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 18 ± 2 horas numa atmosfera normal ou capnófila caso se trate de MHE ou MHF, respetivamente.

Os antibióticos utilizados são pré-definidos pelo próprio laboratório de acordo com as regras do EUCAST e com a terapêutica utilizada para os diferentes microrganismos a nível da farmácia do hospital.

O método de difusão em disco envolve a colocação de um disco de antibiótico sobre o meio de cultura permitindo a sua difusão. A concentração de antibiótico vai sendo cada vez menor à medida que nos afastamos do disco. A interpretação deste método engloba a leitura em milímetros do halo de inibição formado.

No caso do E-test é utilizada uma tira impregnada de antibiótico que sofre difusão quando em contacto com o meio de cultura. Esta inclui uma escala que nos indica a CIM em mg/L, CIM esta correspondente à interseção da elipse de inibição com a tira.

Em ambos os casos a caracterização do microrganismo é feita comparando os valores obtidos com os *breakpoints* estabelecidos pelo EUCAST.

O antibiograma é utilizado de forma a definir a terapêutica mais eficaz para o paciente, assim como reduzir possíveis resistências.

Em relação aos diferentes antibióticos utilizados estes podem ter diferentes mecanismos de atuação, entre eles a inibição da síntese da parede celular (beta-lactâmicos), a inibição da síntese proteica (aminoglicosídeos), a inibição da síntese de ácidos nucleicos (quinolonas) ou a alteração da função da membrana celular (colistina). Estes podem ainda apresentar atividade bactericida ou bacteriostática⁵³.

Mencionando em específico cada produto biológico processado no laboratório:

- Urina

A colheita de urina para uroculturas pode ser realizada de diferentes formas: saco coletor, amostra cateterizada, aspiração suprapúbica, nefrostomia e, a mais comum, jato intermédio. A urina colhida é transferida para tubos de ácido bórico, que funciona como conservante bacteriostático⁴⁹.

Na chegada ao laboratório é primeiro feita a urina tipo II ou sumária de urina utilizando o aparelho Sysmex UF-5000™ (Sysmex). Este, através do princípio de citometria de fluxo fluorescente com foco hidrodinâmico, avalia a presença de parâmetros como eritrócitos, leucócitos, células epiteliais, cilindros, bactérias, entre outros. Os parâmetros com maior peso na decisão de se proceder a uroculturas são a presença de bactérias e o número de leucócitos⁵⁴. As primoculturas são realizadas nos meios GS e CLED.

Quando a amostra tem proveniência do HP são feitas diretamente as uroculturas e a amostra é colocada no aparelho de screening HB&L® (ALIFAX). Aqui a urina é introduzida em frascos com caldo Mueller-Hinton e incubada a 37°C, o que permite a multiplicação de qualquer microrganismo presente. Através da leitura por turbidimetria obtemos resultados num período de três a cinco horas, sendo fornecida a curva de crescimento e a contagem bacteriana em UFC/mL⁵⁵.

Interpretação

As infeções do trato urinário (ITU) são das infeções mais comuns. Estas ocorrem predominantemente em indivíduos do sexo feminino, o que está associado à própria anatomia e ao facto do homem produzir fluídos prostáticos com baixo pH e elevada osmolaridade.

A infeção tanto pode ser ao nível do trato urinário inferior, como é o caso da cistite, ou ao nível do trato urinário superior, como a pielonefrite. Existem três vias de acesso, a hematogénea, linfática e, a mais frequente, a via ascendente⁵⁶.

Os microrganismos mais frequentemente responsáveis por ITU são Enterobactérias (*Escherichia coli* uropatogénica, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp.), *Staphylococcus saprophyticus* e *Enterococcus* spp.⁴⁹.

A valorização das uroculturas é feita de acordo com a Tabela vii.

Tabela vii - Avaliação do crescimento de microrganismos em uroculturas (a semi-quantificação é feita devido à utilização de uma ansa calibrada de 1 µL)

Número de Colónias em Cultura	Equivalente em Unidade Formadora de Colónias (UFC)
0	Negativo
1-10	<10 ⁴ - Crescimento não significativo, apenas considerado em situações específicas (gravidez, transplantados)
10-100	10 ⁴ -10 ⁵ - Valorizar de acordo com historial clínico do paciente, nomeadamente sexo, idade, tipo de serviço, hora da colheita ou histórico de infeções
>100	>10 ⁵ - Valorizar
Polimicrobiano (presença de três ou mais microrganismos distintos)	Flora mista - Pedir nova colheita

Nas culturas onde tenhamos colónias puras do microrganismo relevante com quantificação superior a 10^5 UFCs, procede-se de imediato para identificação e antibiograma. Existem casos onde há necessidade de proceder a repicagem antes de avançar.

Na interpretação das nossas culturas é de extrema importância verificar a informação clínica presente como, por exemplo, a forma de colheita. No caso da aspiração suprapúbica a presença de qualquer microrganismo é um possível agente infeccioso, uma vez que esta é uma amostra estéril⁵⁷.

- Sangue

O sangue é colhido para garrafas de hemocultura (primeiras a ser colhidas antes dos restantes tubos de sangue) e a sua colheita engloba a punção de uma veia periférica em condições de assepsia. O volume recomendado é de 10 mL para adultos e variável de acordo com o peso para crianças, sendo obrigatória a colheita de pelo menos duas hemoculturas de locais diferentes. Isto permite evitar erros de má colheita (contaminação pela microbiota da pele) ou detetar microrganismos que não se apresentem continuamente na corrente sanguínea (bacteriemia intermitente)⁴³.

Após a triagem das garrafas de hemocultura Bact/Alert® FA Plus estas são colocadas no aparelho Bact/Alert® Virtuo® (bioMérieux) para a obtenção de quaisquer microrganismos aeróbios, anaeróbios facultativos ou fungos leveduriformes. As garrafas incluem na sua composição um caldo tríptico de soja, meio nutritivo e não seletivo, que permite o crescimento da maioria dos microrganismos assim como a produção e deteção correta do CO₂. Para além disso contêm anticoagulante e resinas poliméricas que neutralizam antibióticos que possam ter sido administrados, facilitando a recuperação do possível microrganismo. Estes componentes são separados por uma membrana semipermeável do sensor de pH do CO₂. Quando a garrafa é colocada no aparelho é medido o CO₂ inicial e a partir daí são feitas leituras a cada 10 minutos. As amostras são incubadas a uma temperatura de 37°C até um período máximo de cinco dias.

A positividade é avaliada pela produção de CO₂ (associado ao crescimento e multiplicação dos microrganismos) que se dissolve no meio tornando-o mais ácido. Este modifica o pH e faz com que haja a alteração da cor do sensor de cinzento para amarelo, que é detetada por técnicas colorimétricas⁵³.

Numa hemocultura positiva procedemos à realização do esfregaço corado pela coloração de Gram e inoculação em GS. A observação do esfregaço nestes casos é de extrema importância, uma vez que pode orientar para uma terapêutica empírica.

Determinadas hemoculturas positivas (provenientes do HP) ou casos referidos como possível sepsis, sinalizados pelo Serviço de Colheitas, são colocadas no aparelho Accelerate PhenoTest® BC (Accelerate Diagnostics). Este permite uma rápida identificação fenotípica do microrganismo, num período máximo de duas horas, e respetivo teste de sensibilidade, em sete horas (Anexo 3)⁵⁸. Em concomitância é sempre feito o procedimento clássico.

Interpretação

O sangue é um fluido estéril, portanto qualquer microrganismo que seja daqui isolado pode ser responsável pela infeção. No entanto, é preciso ter em atenção possíveis contaminantes presentes na microbiota da pele, como é o caso de *Staphylococcus coagulase negativa*⁵⁹.

Na maioria das situações de infeção existe apenas um agente infeccioso, sendo exemplos de microrganismos encontrados *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ou *Klebsiella spp.*⁶⁰.

- Amostras respiratórias (expetoração, aspirado brônquico, lavado broncoalveolar)

As amostras respiratórias são das amostras mais frequentes no laboratório a seguir às amostras de urina. A colheita da expetoração pode ser feita logo pela manhã pelo próprio paciente, que deve lavar a boca com água e de seguida colher o produto para um contentor estéril através de tosse produtiva profunda. Em relação às amostras de aspirado brônquico e lavado broncoalveolar (LBA) a sua colheita é feita por pessoal especializado através de fibroscopia do conteúdo brônquico ou do conteúdo alveolar, respetivamente⁴⁹.

A nível laboratorial é feito o esfregaço corado pela coloração de Gram e os meios de cultura utilizados são a GS, HAE e PVX. Nos casos de Fibrose Quística e Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica (DPOC) são adicionados os meios BCSA e SGC.

Interpretação

Na expetoração são avaliadas características macroscópicas, como coloração (verde, amarela, branca) e presença de pus ou sangue. Para a realização do esfregaço e inoculação dos meios o produto deve ser retirado preferencialmente das zonas que possuem o pus/sangue. Este produto tem associada uma rica microbiota da cavidade oral e, como tal, há um cuidado acrescido na sua interpretação.

A informação fornecida pelo esfregaço corado pela coloração de Gram permite-nos verificar se amostra foi bem colhida, se estamos na presença de uma infeção e quais os microrganismos predominantes. Para caracterizar a sua qualidade focamo-nos na quantidade de células epiteliais e o que nos indica a presença de infeção é o número de leucócitos. Ambos

os parâmetros são avaliados de acordo com a seguinte classificação: 1 (<10 por campo, raras), 2 (entre 10-25 por campo, algumas) e 3 (>25 por campo, muitas). No caso dos aspirados brônquicos e LBA é tido em conta também a presença de células brônquicas.

O aspirado brônquico e o LBA são fluídos estéreis portanto, caso seja detetado algum microrganismo, é de se esperar que esteja presente em ambos.

As principais bactérias e fungos responsáveis por infeções do trato respiratório são *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, Enterobactérias e *Candida spp.*⁶¹.

A Fibrose Quística corresponde a uma doença autossómica recessiva associada a uma mutação no gene de uma proteína transportadora de cloretos que é caracterizada por alterações a nível respiratório, glandular, digestivo e reprodutor. As suas consequências pulmonares implicam desidratação das secreções e aumento da viscosidade do muco. Os portadores são indivíduos que ficam sujeitos a um maior risco de desenvolver complicações respiratórias devido a infeções provocadas principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae*⁶².

- Fezes

Os sintomas mais comuns de uma infeção a nível gastrointestinal são vómitos e diarreia. Posto isto, quando um paciente os apresenta o clínico pede uma colheita de fezes. Esta pode ser realizada pelo próprio, utilizando uma espátula e colhendo uma quantidade de fezes representativa, de preferência de zonas que apresentem pus ou sangue⁴³.

A suspeita do tipo de microrganismo pode advir da história clínica do paciente, patologias associadas, viagens recentes ou alteração na água/alimentos consumidos. É com base nessa suspeita e, tendo em conta quais as principais bactérias responsáveis por infeções gastrointestinais, que são definidos os meios de coproculturas: SS, HEKT, CIN, CAM, SMAC (este último apenas para amostras com proveniência do HP) e o caldo de enriquecimento de bacilos Gram negativo⁴⁹.

Interpretação

Quando avaliamos este produto é bastante importante ter em atenção a sua consistência (mole, dura, líquida) e presença de pus/sangue. Para além disso, o cólon é um local com uma microbiota muito rica daí ser importante a distinção dos microrganismos que normalmente colonizam o intestino dos que causam infeções.

As principais bactérias responsáveis por infecções do trato gastrointestinal são *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp., *Campylobacter* spp., *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 e *Clostridium* spp.⁶¹.

- Líquido cefalorraquidiano (LCR)

As amostras de LCR são colhidas por profissionais para contentores estéreis através de punção lombar, devendo ser imediatamente processadas. É uma amostra de difícil colheita que deve ser manuseada em condições de assepsia de forma a evitar possíveis contaminações. Esta pode ser utilizada para estudos citológicos, bioquímicos e microbiológicos.

O seu processamento para deteção de microrganismos engloba a centrifugação a 2500 rpm durante 10 minutos a 23°C, sendo utilizado o sedimento daí resultante. A partir deste é feita a lâmina para ser corada pela coloração de Gram (colocando com uma pipeta duas gotas do sedimento sem espalhar) e são inoculados os meios GS, PVX e BHI⁴³.

Interpretação

Na maioria das suspeitas de encefalites ou meningites é colhido LCR. Este produto biológico é avaliado a nível macroscópico (límpido ou turvo), citológico (tipo de leucócitos presente) e bioquímico (glicose e proteínas).

O LCR é um líquido estéril, portanto qualquer microrganismo presente é o responsável pela infeção. Como a quantidade do agente infeccioso presente é muito reduzida existe a necessidade de concentrar a amostra de modo a aumentar a probabilidade de o encontrar.

As bactérias mais associadas a infeções do LCR são *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Listeria monocytogenes* e os fungos mais associados são *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*⁶¹.

- Zaragatoa de ferida cirúrgica/não cirúrgica, vaginal ou uretral

As zaragatoas são colhidas por pessoal especializado e colocadas no respetivo meio de transporte, permitindo a conservação de quaisquer microrganismos presentes.

O ideal é serem sempre colhidas duas zaragatoas para os exsudados vaginais e para os exsudados de feridas, devendo a colheita deste último ser feita nos bordos pois é onde o microrganismo se encontra mais ativo.

A nível laboratorial é feito o esfregaço corado pela coloração de Gram e os meios utilizados estão de acordo com os principais agentes infecciosos que podem ser encontrados

nessas localizações. As zaragatoas de exsudado de feridas são semeadas em GS e as zaragatoas vaginais e uretrais são semeadas em GS, VCAT 3 e CNA. Quando apenas temos uma zaragatoa são sempre inoculados primeiro os meios de cultura e só depois é feita a lâmina do esfregaço.

Interpretação

Neste tipo de amostra por vezes pode ser difícil a obtenção do agente responsável.

Nos exsudados de ferida cirúrgica normalmente qualquer microrganismo é considerado, já nos exsudados de ferida não cirúrgica (colheita mais superficial) alguns agentes possíveis são *S. aureus* e *Enterococcus spp.*

No caso dos exsudados vaginais e uretrais podem ser encontradas bactérias responsáveis por infeções sexualmente transmissíveis (*Neisseria gonorrhoeae*) ou microrganismos da microbiota que se tornam oportunistas (*C. albicans*, *L. monocytogenes*)⁴³.

- Outros líquidos biológicos

Aqui estão incluídos líquidos como o líquido pleural, pericárdico, peritoneal e sinovial. Este tipo de produto é colhido por pessoal especializado utilizando uma seringa para contentores esterilizados ou frascos de hemocultura. Os líquidos biológicos são estéreis e, como tal, a presença de microrganismos é de valorizar⁴³.

É sempre feito o esfregaço corado pela coloração de Gram e inoculação em GS, PVX e BHI para os líquidos pleural, pericárdico e sinovial, e em GS e CM para o líquido peritoneal.

Neste tipo de amostras para além de microrganismos aeróbios podemos encontrar anaeróbios. Daí a observação do Gram e dos meios de enriquecimento permitir dar uma orientação nesse sentido⁶¹.

- Exsudados purulentos, pus de abscesso e bÍlis

Diferentes produtos biológicos, todos colhidos por pessoal especializado para frascos Portagerm™. Estes transportam a amostra em condições de anaerobiose, permitindo a obtenção de aeróbios e anaeróbios presentes. No meio de transporte existe resazurina que por alteração de cor de incolor para azul nos alerta para a presença de oxigénio dentro do frasco⁶³.

Para estes produtos é feito o esfregaço corado pela coloração de Gram e as amostras são inoculadas em meio GS e CM.

- Biópsias

Esta amostra envolve uma colheita invasiva por pessoal especializado do produto biológico para contentores estéreis. O seu processamento envolve a realização do máximo de cortes da porção de tecido com o bisturi, de modo a que os pedaços da amostra que são cultivados contêm o microrganismo⁴³. Os meios utilizados são GS e BHI ou CM (dependendo da localização da biópsia).

8.2 Micologia

A área da Micologia no CHUC estuda os fungos responsáveis por infeções a nível hospitalar, tanto leveduriformes como filamentosos.

Os fungos são organismos eucariotas, metabolicamente heterotróficos e a grande maioria é aeróbio obrigatório, que obtém os seus nutrientes por absorção. Em termos de constituição estes apresentam uma parede celular composta por quitina e uma membrana celular cujo lípido principal é o ergosterol.

Cada vez mais são uma das causas de infeção em indivíduos imunocomprometidos (transplantados, portadores de HIV, doentes oncológicos), apresentando-se muitas vezes como oportunistas. Já a porção de fungos patogénicos para o ser humano é pequena, como é o exemplo do *Histoplasma capsulatum*.

Estes podem ser isolados de diversas amostras, tais como pele, cabelo, unhas, amostras respiratórias, sangue, LCR, entre outras. A suspeita da presença de um fungo muitas vezes está associada ao historial do paciente, tendo por base dados epidemiológicos (profissão, viagens recentes), patologias associadas ou terapêuticas realizadas. Com base nisso as amostras são inoculadas em meio SGC e colocadas a incubar numa estufa a 30°C com alguma humidade. Quando se suspeita de dermatófitos estes são colocados a uma temperatura de 25°C. O tempo de incubação varia, sendo necessários pelo menos entre 21 e 30 dias até se classificar uma cultura como negativa.

No que toca a leveduras estas são identificadas através da técnica Maldi-TOF-MS onde podemos distinguir fungos leveduriformes relevantes clinicamente, como *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans* ou *Rhodotorula rubra* (Figura 10). Em relação aos fungos filamentosos à medida que estes crescem e se desenvolvem apresentam proteínas em constante alteração, tornando difícil a criação de um perfil para a identificação através



Figura 10 - Levedura *Rhodotorula rubra*. Fotografia tirada no CHUC.

do Maldi-TOF-MS. Para a sua caracterização e realização do diagnóstico definitivo são avaliadas as características macroscópicas e microscópicas.

No que toca à macroscopia importa ter em atenção a pigmentação, textura, tipo de micélio, taxa de crescimento, entre outras. Para a realização da avaliação microscópica é utilizado o método de fragmento da colónia sobre uma gota de azul de lactofenol e observação ao microscópio na objetiva de 10X e de 40X. Na microscopia é importante analisar a estrutura das hifas e a morfologia dos esporos.

Por vezes os fungos isolados na amostra fazem parte da microbiota do indivíduo (colonização) ou são contaminações, não tendo qualquer relevância no diagnóstico do paciente.

O antifúngico mais utilizado no tratamento de infeções fúngicas é o flucozanol⁶³.

Focando no microrganismo *Pneumocystis jirovecii*, uma espécie que já foi considerada um parasita mas hoje em dia é classificada como fungo. Este pode colonizar o pulmão do ser humano, transmitindo-se por via respiratória. Em indivíduos saudáveis causa uma infeção assintomática e fica em estado latente, manifestando-se apenas quando ocorre algum tipo de imunossupressão (portadores de HIV). Nestas situações pode ser responsável pela ocorrência de uma pneumonia intersticial difusa.

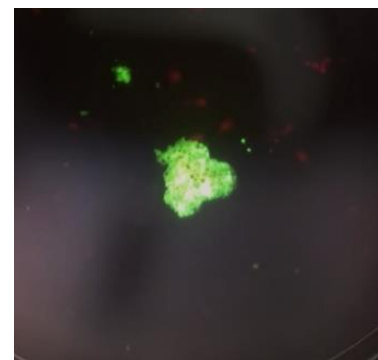


Figura 11 - Observação ao microscópio de fluorescência de quistos de *Pneumocystis jirovecii* numa amostra de LBA. Fotografia tirada no CHUC.

O diagnóstico é feito através de imunofluorescência direta pela observação de quistos e trofozoítos, sendo a amostra ideal o LBA. A preparação desta inclui duas a três lavagens, seguidas de centrifugação a 1500 g durante cinco minutos. Sobre o sedimento resultante são colocados anticorpos monoclonais marcados com isotiocianato de fluoresceína específicos para quistos e trofozoítos de *P. jirovecii*. Através da observação ao microscópio de fluorescência é possível observar as estruturas com uma coloração fluorescente verde maçã. Os quistos são redondos de grande dimensão, como observado na Figura 11 (para ser considerado é necessário existirem mais de dois), e os trofozoítos apresentam forma de quarto crescente⁴⁹.

8.3 Parasitologia

Hoje em dia as infecções parasitárias encontram-se distribuídas por todo o Mundo, apesar de existirem nichos endêmicos. Esta crescente distribuição está associada ao aumento do número de viagens, ao uso descontrolado de antibióticos, às alterações climáticas e ao elevado número de indivíduos imunodeprimidos.

O parasitismo implica uma dependência metabólica por parte do parasita para com o hospedeiro. Este pode causar infeção em qualquer órgão do corpo humano, podendo também existir dispersos em circulação, sendo a sua transmissão feita através de água/alimentos, contacto sexual, trauma ou vetores.

Os parasitas encontram-se divididos em dois sub-reinos principais: os Protozoários, onde estão incluídos os flagelados, ciliados, amebas e Apicomplexa; e os Metazoários, que incluem os Nematelmintas, Platelmintas (Trematoda e Cestoda) e artrópodes⁶³.

As amostras para o diagnóstico parasitológico podem ser ajustadas consoante a suspeita, sendo as mais frequentes fezes e sangue.

A colheita de fezes é realizada durante três dias alternados devendo ser colhida uma quantidade representativa (1/3 do contentor) para cada contentor. Estas são primeiro analisadas macroscopicamente em termos de consistência (sólida, pastosa, diarreica), presença de sangue/muco e ainda observação de vermes adultos ou dos seus fragmentos. Posteriormente, é feito o exame após concentração baseado no método bifásico de Ritchie, utilizando o *kit* ParasiTrap[®] (Biosepar), de forma a obtermos um sedimento que é observado ao microscópio nas objetivas de 10X e 40X⁶⁴.

Em relação às amostras de sangue são feitos esfregaços sanguíneos finos e em gota espessa corados pela coloração de Giemsa⁴⁹. No caso dos esfregaços sanguíneos finos existe uma maior integridade da amostra, o que facilita a identificação do parasita. No caso do esfregaço em gota espessa concentramos numa menor área uma maior quantidade de amostra, o que aumenta a sensibilidade da deteção do parasita. A observação microscópica das características morfológicas (tamanho, cor, forma) para a sua identificação é feita nas objetivas de 50X e 100X.

Nas suspeitas de parasitoses é de extrema relevância a história clínica do paciente que permite uma correta orientação no que toca à pesquisa do parasita responsável. Aqui importam dados como viagens realizadas recentemente, estado imunitário, patologias associadas e terapêutica recente⁶³.

Tive oportunidade de observar vários parasitas, tanto de pacientes como de amostras de controlo de qualidade externo, dos quais destaco:

8.3.1 *Plasmodium* spp.

Agente responsável pela malária, pertencente ao filo Apicomplexa. Dentro deste género existem cinco espécies diferentes responsáveis pela infeção no ser humano: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi*.

O parasita é transmitido através da picada da fêmea do mosquito do género *Anopheles* e no sangue do ser humano podem aparecer as seguintes formas parasitárias: trofozoítos, esquizontes e gametócitos.

P. falciparum: infeta eritrócitos em diferentes fases de maturação, que mantêm o seu tamanho. No esfregaço podem observar-se elevadas parasitémias (quantidade de eritrócitos parasitados em função do total de eritrócitos), granulações de Maurer (pontuações avermelhadas próximas da membrana do eritrócito), poliparasitismo e alguns parasitas apresentam-se na marginal do eritrócito (fenómeno de bordo). Os trofozoítos têm forma de anel (Figura 12 A) e os gametócitos forma de “banana” (Figuras 12 B), não se observando outras formas evolutivas. Excetuando nas situações de acesso pernicioso em casos graves de malária com altas parasitémias, onde pode ocorrer o rompimento de trombos nos capilares e libertação de esquizontes para o sangue periférico.

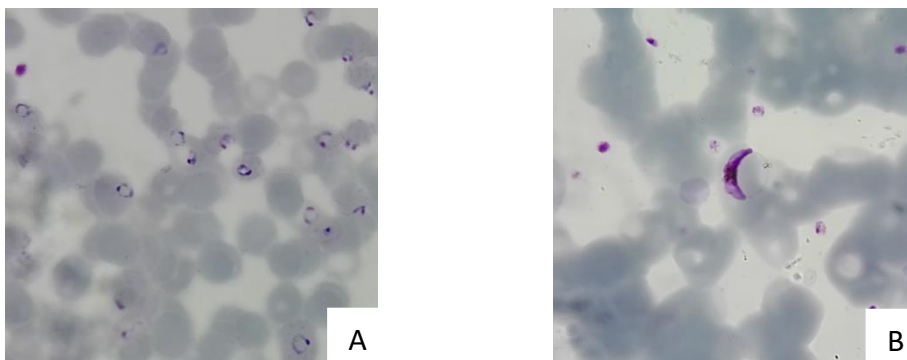


Figura 12 - A - Esfregaços de sangue periférico fino onde se observam trofozoítos de *P. falciparum* (em anel) e os fenómenos de poliparasitismo e de bordo. Fotografia tirada no CHUC. B - Esfregaço de sangue periférico fino onde se observam gametócitos (forma de “banana”) com pigmento malárico acastanhado. Fotografia tirada no CHUC.

P. vivax: infeta reticulócitos, apresenta baixa parasitémia e podem ser observadas granulações de Schüffner (granulações vermelhas, pequenas e redondas). Os trofozoítos têm aspeto amebóide, os esquizontes forma de rosácea com 12 a 24 merozoítos e os gametócitos são arredondados.

P. ovale: semelhante a *P. vivax*, diferindo na capacidade de causar um aumento do tamanho dos eritrócitos parasitados e os seus esquizontes contêm entre seis e 12 merozoítos.

P. malariae: apresenta baixas parasitêmias e os eritrócitos mantêm o seu tamanho. Os trofozoítos apresentam-se em banda equatorial, os esquizontes em rosácea contêm seis a 12 merozoítos (Figura 13) e os gametócitos são arredondados.

P. knowlesi: pode ser observado o fenómeno de poliparasitismo com eritrócitos de tamanho normal. O trofozoítos apresentam-se em banda ou anel, os esquizontes contêm 16 merozoítos e os gametócitos ocupam todo o eritrócito⁶³.

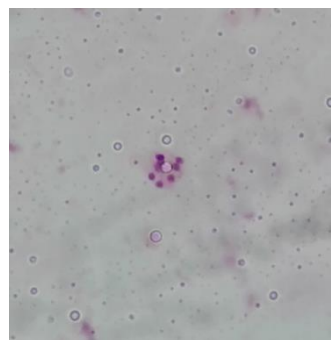


Figura 13 - Esfregaço em gota espessa onde se observa o esquizonte de *P. malariae* com oito merozoítos. Fotografia tirada no CHUC.

8.3.2 *Leishmania* spp.

Flagelado transmitido pelos insetos hematófagos da família *Phlebotomidae*. Existem diversas espécies responsáveis por diferentes leishmanioses: cutânea, mucocutânea ou visceral.

Nas amostras de sangue as espécies de *Leishmania* spp. têm a capacidade de parasitar células fagocíticas, aparecendo sob a forma amastigota (Figura 14) onde se observa o núcleo e cinetoplasto⁴⁹.

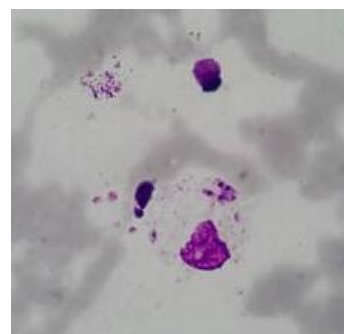


Figura 14 - Esfregaço de sangue periférico fino onde se observa a forma amastigota de *Leishmania* sp.. Fotografia tirada no CHUC.

8.3.3 *Trypanosoma* spp.

Hemoflagelado que inclui duas espécies principais: *Trypanosoma cruzi*, responsável pela doença de Chagas, e *Trypanosoma brucei*, responsável pela doença do sono.

T. cruzi desenvolve-se no tubo digestivo de triatomíneos podendo aparecer sob duas formas no ser humano, a amastigota (nos tecidos) ou a tripomastigota (no sangue, Figura 15 A). Este completa o seu ciclo de vida no ser humano nos músculos esquelético ou cardíaco ou em macrófagos.

T. brucei utiliza como vetor a mosca Tsé tsé e no sangue apresenta estádios extracelulares na forma de tripomastigota (Figura 15 B)⁶³.

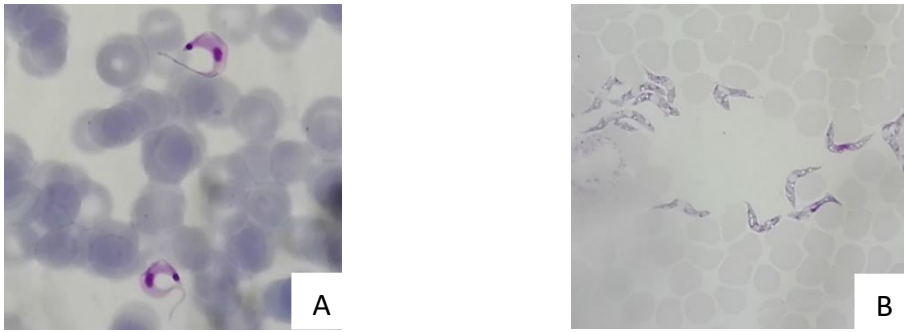


Figura 15 - A - Esfregaço sanguíneo fino com tripomastigotas de *T. cruzi* (cinetoplasto posterior ao núcleo, membrana ondulante, forma em C ou U, flagelo na região anterior). Fotografia tirada no CHUC. B - Esfregaço sanguíneo fino com tripomastigotas de *T. brucei* (mesma características apresentadas por *T. cruzi* exceto a forma que se apresenta mais ondulada). Fotografia tirada no CHUC.

8.3.4 *Ascaris lumbricoides*

Nematoda transmitido de forma fecal-oral, bastante encontrado em zonas pobres em termos de condições sanitárias. O verme adulto (Figura 16) e os seus ovos podem ser pesquisados nas fezes⁴⁹.

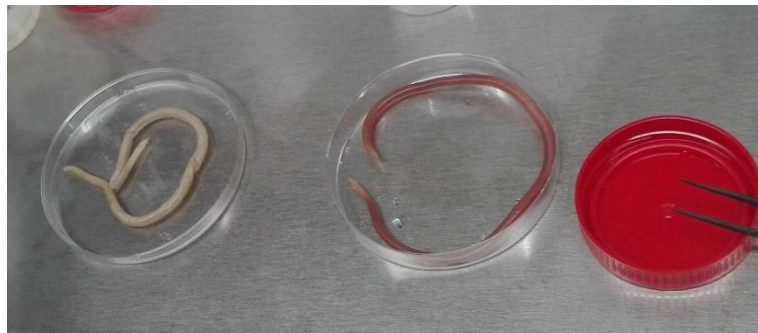


Figura 16 - Dois vermes adultos de *A. lumbricoides*, redondos, com coloração rosada, extremidades afiladas e cujo tamanho varia entre 15 e 25 cm. Fotografia tirada no CHUC.

8.3.5 *Schistosoma haematobium*

Trematoda responsável pela esquistossomíase. Uma espécie que se encontra distribuída geograficamente ao nível de África e cuja transmissão ocorre em ambiente aquático por penetração da pele pela cercária.

O seu diagnóstico envolve a pesquisa de ovos na urina, sendo aconselhada a colheita após esforço físico (saltar ou descer escadas). Um exemplo de ovo observado encontra-se na Figura 17⁴⁹.



Figura 17 - Ovo embrionado de *S. haematobium* com cílios e espícula terminal. Fotografia tirada no CHUC.

8.4 Micobacteriologia

Micobactérias são bacilos ácido-álcool resistentes aeróbios estritos, que possuem ácidos micólicos na constituição da sua parede celular. O género engloba mais de 60 espécies diferentes.

Mycobacterium tuberculosis complex é um grupo de micobactérias que ao infetar o ser humano é sempre considerado um agente patogénico obrigatório. Este é responsável pela tuberculose, que clinicamente pode envolver diferentes órgãos, como rins, ossos ou o mais comum, os pulmões. Os sintomas mais associados são a perda de peso, tosse crónica com sangue e suores noturnos.

A transmissão é feita através de aerossóis, ocorrendo a infeção primária a nível pulmonar. O microrganismo vai até aos alvéolos onde é fagocitado pelos macrófagos e uma pequena percentagem tem a capacidade de resistir, sendo libertada aquando da morte destes. As micobactérias conseguem evadir ao Sistema Imune e entram no sistema linfático e corrente sanguínea, espalhando-se por todo o corpo. Os indivíduos mais suscetíveis são os imunocomprometidos⁴⁹.

Como a transmissão é feita por aerossóis e a sua patogenicidade é elevada a manipulação dos produtos biológicos para esta pesquisa é feita numa área específica e utilizando câmaras de segurança biológica classe II.

No diagnóstico da tuberculose a história clínica é suportada por exames radiológicos em associação com a deteção laboratorial. As micobactérias podem ser pesquisadas em qualquer produto biológico devido à sua dispersão, sendo o mais frequente as amostras respiratórias. No caso da colheita da expetoração esta é aconselhada ser feita em três dias consecutivos, uma vez que a emissão das micobactérias não é contínua.

O processamento das amostras inclui um processo de homogeneização/liquefação, descontaminação e concentração. Este envolve a utilização do BD BBL™ MycoPrep™ Kit que é composto por hidróxido de sódio a 2% (NaOH), agente mucolítico tóxico para a maioria dos microrganismos contaminantes. Inclui também N-acetil-L-cisteína (NALC) como agente mucolítico e citrato de sódio que se liga aos iões de metais pesados quelando-os para uma melhor ação da NALC. De forma a parar a reação é utilizado tampão fosfato que a neutraliza. As amostras são depois concentradas através de centrifugação a 3000 g durante 15 minutos, sendo apenas utilizado o sedimento. Nas amostras estéreis e líquidas, como é o caso do LCR, o processamento inicial não é necessário⁶⁵.

8.4.1 BACTEC™ 9120

Para a pesquisa de micobactérias no sangue são utilizadas garrafas de hemocultura BD BACTEC™ Myco/F Lytic Culture Vials que contêm no seu interior o meio não seletivo Middlebrook 7H9 e BHI. As garrafas são incubadas a 35°C no aparelho BACTEC™ 9120 (Becton Dickinson) e permanecem em constante agitação por um período máximo de 42 dias. O crescimento de microrganismos é detetado através da diminuição do oxigênio presente, devido ao seu consumo pelas micobactérias para a realização do seu metabolismo⁶⁶.

Em relação ao meio Middlebrook 7H9 este inclui sais inorgânicos, cloreto de sódio, albumina bovina, dextrose e glicerol, que potenciam o crescimento das micobactérias⁶⁷.

8.4.2 Esfregaço corado pela coloração de Ziehl-Neelsen modificada

O esfregaço pode ser obtido diretamente a partir da amostra, após o seu processamento ou a partir de qualquer um dos meios de crescimento positivos. A coloração de Ziehl-Neelsen modificada, ou coloração de Kinyoun, tem como objetivo distinguir bactérias ácido-álcool resistentes. Esta utiliza um corante primário, carbol fucsina, que cora todas as bactérias de rosa. De seguida, administra-se o diferenciador ácido-álcool que descora todas as estruturas celulares. No caso das micobactérias o diferenciador não tem atividade. Por fim, é adicionado o corante de contraste, azul de metileno, que ajuda na distinção das micobactérias caso estejam presentes. Através da observação ao microscópio, na objetiva de 50X, do esfregaço proveniente de um Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias (MGIT) com crescimento positivo, conseguimos verificar a presença de micobactérias coradas de rosa em forma de cordões num fundo azul (Figura 18). Os esfregaços são depois classificados em não observado, 1+ (1 a 10/100 campos), 2+ (1 a 10/10 campos), 3+ (1ª 10/campo) ou 4+ (>10/campo)⁶⁵.

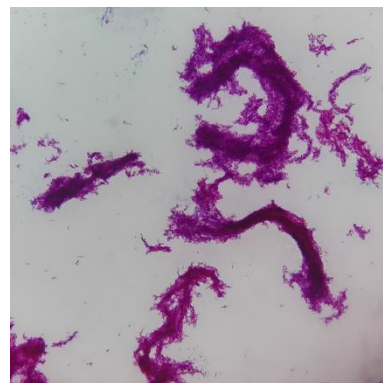


Figura 18 - Esfregaço corado pela coloração de Ziehl-Neelsen modificada onde se observam cordas sugestivas de *M. tuberculosis* complex. Fotografia tirada no CHUC.

8.4.3 Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias (MGIT)

Os tubos de MGIT contêm caldo modificado de Middlebrook 7H9 ao qual é adicionada uma mistura de antibióticos e antifúngicos, designada de PANTA (polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim e azlocilina).

Utilizando o sistema automático BACTEC™ MGIT™ 960 (BD) é possível não só fazer a deteção de micobactérias como também o seu TSA. A deteção é feita através da presença

de fluoróchromos sensíveis ao oxigénio livre em solução. À medida que as bactérias se multiplicam há consumo de oxigénio e a sua substituição por dióxido de carbono. Desta forma, o fluoróchromo deixa de ser inibido, emitindo fluorescência. Os tubos são incubados a 37°C e lidos a cada hora. Estes são considerados negativos se após seis semanas não tiver existido qualquer tipo de emissão de fluorescência⁶⁵.

8.4.4 Meio de cultura Löwenstein-Jensen (LJ)

O meio sólido utilizado para o isolamento de micobactérias é o meio Löwenstein-Jensen, que é colocado numa estufa a 37°C. Este inclui na sua constituição ovo, glicerol (fontes de proteína e ácidos gordos) e verde de malaquite (inibe o crescimento de contaminantes).

A avaliação deste meio deve ser feita diariamente durante seis semanas e, caso haja o crescimento de colónias de *M. tuberculosis complex*, estas apresentam-se esbranquiçadas com um formato de couve-flor (Figura 19)⁴⁹.



Figura 19 - Tubo de LJ com uma colónia sugestiva de *M. tuberculosis complex*. Fotografia tirada no CHUC.

Caso qualquer um dos meios de cultura (MGIT ou LJ) positive é sempre realizado um esfregaço corado pela coloração de Ziehl-Neelsen modificada e inoculada uma placa de GS para ter a certeza que não é um contaminante. De seguida, procede-se à identificação da micobactéria presente.

8.5 Serologia

O Sistema Imune inclui uma componente celular, constituída por células como macrófagos, neutrófilos ou linfócitos, e uma componente humoral, correspondente aos anticorpos.

Os anticorpos ou imunoglobulinas são glicoproteínas sintetizadas a partir de plasmócitos, existindo cinco classes diferentes caracterizadas pela cadeia pesada que os compõem.

Na Serologia do CHUC as classes com maior relevância para o estudo de infeções são:

- IgG, anticorpo que existe em maior percentagem no soro humano, sendo o único com capacidade de atravessar a placenta;
- IgM, anticorpo que existe em menor quantidade no soro, apresentando-se como um pentâmero. Este é o primeiro a ser produzido aquando do contacto com um antígeno;

- IgA, o segundo anticorpo mais comum no soro, apresentando-se sob a forma de um dímero. Este funciona como primeiro sistema de defesa ao nível das mucosas, estando presente em secreções como a saliva.

A Serologia é uma área que tem como base a interação antígeno-anticorpo, permitindo a deteção e quantificação do anticorpo presente e a avaliação da evolução de infeções. Estes anticorpos resultam da exposição a um agente infeccioso⁴⁹.

São várias as técnicas realizadas no laboratório para a deteção das imunoglobulinas, nomeadamente:

8.5.1 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

Os anticorpos presentes na amostra ligam-se ao antígeno adsorvido em cúpulas de uma microplaca, formando o complexo antígeno-anticorpo. De seguida, é adicionado um anticorpo anti-imunoglobulina humana marcado com a enzima peroxidase. Para revelar a presença do complexo é utilizado um substrato cromogénico, que por ação enzimática origina cor. A intensidade da cor é diretamente proporcional à quantidade de anticorpo⁴⁹.

8.5.2 Ensaio de Fluorescência Enzimática (ELFA)

Adicionamos a amostra a um suporte constituído por cones que têm adsorvido o antígeno para o anticorpo de interesse. De seguida, é adicionado um anticorpo anti-imunoglobulina humana marcado com fosfatase alcalina. Após a reação de hidrólise entre a enzima e um substrato marcado com uma substância fluorescente, é medida a fluorescência emitida a 450 nm, que é proporcional à concentração de anticorpo⁶⁸.

8.5.3 Imunoensaio de Micropartículas por Quimioluminescência (CMIA)

Utiliza antígenos recombinantes específicos que revestem micropartículas magnéticas, permitindo a ligação ao anticorpo de interesse. De seguida, é adicionado um anticorpo monoclonal anti-imunoglobulina humana ligado a isoluminol e são adicionados reagentes que iniciam a reação quimioluminescente. O sinal daí resultante é proporcional à quantidade de anticorpo⁶⁹.

8.5.4 Rosa de Bengala

Teste qualitativo para detecção de anticorpos IgM ou IgG anti-*Brucella abortus* através de uma reação de aglutinação. Este envolve a adição de uma suspensão inativada e corada com rosa de bengala de *Brucella abortus* ao soro do paciente. A positividade é observada através da presença de aglutinados na placa, como é o caso do controlo positivo da Figura 20⁷⁰.



Figura 20 - Teste negativo de Rosa de Bengala. Fotografia tirada no CHUC.

8.5.5 Rapid Plasma Reagin (RPR)

RPR-Carbon (BioSystems) é um teste não treponémico para detecção de *Treponema pallidum*. Este determina a presença de reaginas (anticorpos formados contra lípidos derivados de células infetadas por *T. pallidum*) no soro do paciente. As reaginas ligam-se ao antigénio constituído por cardiolipina, lecitina e colesterol associado a carvão ativado. Quando o teste é positivo observa-se aglutinação e a positividade é caracterizada pela maior diluição onde esta se apresenta.

Utilizando o RPR podemos fazer a monitorização da infeção e do seu tratamento⁴⁹.

8.5.6 Treponema Passive Particle Agglutination (TP-PA)

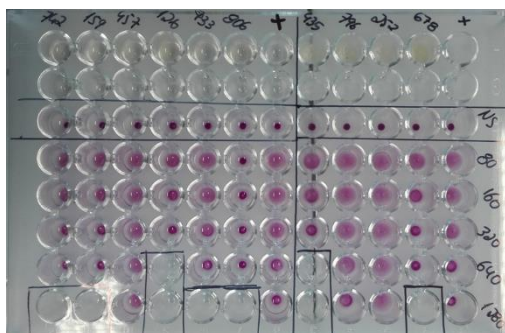


Figura 21 - Exemplo de testes TP-PA. Fotografia tirada no CHUC.

O Kit Serodia TP-PA (Fujirebio Inc) é um teste treponémico que utiliza o princípio de aglutinação em microplaca. Neste caso, são utilizadas partículas de gelatina em suspensão sensibilizadas com antigénio de *T. pallidum*.

Este é um teste qualitativo e semi-quantitativo para a presença de anticorpos anti-*T. pallidum* IgM ou IgG. Caso as partículas estejam concentradas no centro do poço este é considerado negativo. Caso exista aglutinação forma-se um anel bem definido periférico ou as partículas ficam dispersas de modo uniforme e este é considerado positivo (exemplos presentes na Figura 21)⁴⁹.

8.5.7 Imunofluorescência Indireta (IFI)

Utilização de uma lâmina que à superfície tem adsorvido o antigénio para a pesquisa do anticorpo de interesse. Numa primeira fase, caso a amostra seja positiva, forma-se um

complexo antígeno-anticorpo que é revelado através da utilização de um anticorpo anti-imunoglobulina humana marcado com fluoresceína. A lâmina é observada no microscópio de fluorescência, permitindo uma avaliação qualitativa e semi-quantitativa da titulação do anticorpo. A intensidade de fluorescência é diretamente proporcional à concentração da imunoglobulina⁷¹.

O principal produto biológico utilizado na Serologia é o soro, podendo em alguns casos ser utilizado LCR.

A colheita das amostras deve ser feita na fase aguda da infecção e novamente na fase de convalescença, duas a três semanas depois, permitindo uma correta avaliação da cinética dos anticorpos. Um aumento de quatro vezes o seu título faz o diagnóstico da maioria das infecções. A titulação permite a detecção e também a monitorização de doenças infecciosas.

Normalmente a presença de anticorpos IgM indica que estamos perante uma infecção primária e a presença de anticorpos IgG está associada a situações de infecção passada, podendo em determinados casos conferir imunidade⁶³. Aquando da presença simultânea de anticorpos IgM e IgG é por vezes necessário distinguir o tempo ocorrido desde o início da infecção e para isso é feita a avidéz da IgG. Este teste faz uso de um agente desnaturante, como a ureia, para quebrar a ligação do complexo antígeno-anticorpo. Quando a avidéz é alta significa que há uma maior interação antígeno-anticorpo e, portanto, a infecção ocorreu há mais de quatro meses⁴⁹.

As serologias mais solicitadas no CHUC são para:

- *Treponema pallidum*, bactéria responsável pela sífilis. Para o seu diagnóstico utiliza-se o seguinte algoritmo: primeiro é feito o rastreio dos anticorpos IgM/IgG através de CMIA e caso este seja positivo procede-se à titulação por RPR. Quando o RPR é reativo estamos na presença de uma infecção recente que tem de ser confirmada por testes treponémicos, nomeadamente a pesquisa específica de anticorpos IgM. Nos casos em que o RPR dá não reativo são realizados testes treponémicos, como o TP-PA ou o Fluorescent Treponemal Antibody Absorption Test (FTA-Abs). Este último é uma técnica de imunofluorescência indireta que permite a pesquisa de anticorpos IgG contra *T. pallidum*. Caso o TP-PA ou o FTA-Abs sejam positivos confirmam a presença de uma infecção passada pela bactéria.

Os anticorpos treponémicos ao contrário dos não treponémicos mantêm-se para o resto da vida do indivíduo⁶³.

- Vírus da Hepatite B, agente patogénico que infeta os hepatócitos causando hepatites. Este pode ser transmitido por diferentes vias, entre elas a via perinatal, sexual e parentérica.

Com base nos sintomas de dor abdominal, icterícia e aumento de enzimas hepáticas o clínico pode suspeitar desta infeção.

No diagnóstico serológico de Hepatite B esta pode ser classificada como Hepatite B aguda, quando estamos na presença do antígeno de superfície (HBsAg) e antígeno e (HBeAg) (vírus encontra-se em fase replicativa), ou como Hepatite B crónica, quando estão presentes o HBsAg por um período superior a 6 meses, anticorpo total de core (Anti-HBc total) e o HBeAg ou o anticorpo anti-e (Anti-HBe)⁶³.

- SARS-CoV-2, vírus responsável pela atual pandemia de Coronavírus Disease 2019 (COVID-19). Este é transmitido através de aerossóis e os principais sintomas associados são tosse, febre, falta de paladar e olfato.

No CHUC são determinados os anticorpos IgM contra a nucleocápside do vírus ou os anticorpos IgM e IgG contra a proteína *spike* através de CMIA. A serologia deste vírus ainda está a ser pesquisada, sendo que alguns estudos referem o aparecimento dos anticorpos IgM em simultâneo com os anticorpos IgG⁷².

Para além disso em grupos populacionais específicos é sempre feita a serologia como forma de prevenção. Nas grávidas é sempre avaliado o acrónimo STORCH (sífilis, toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus e herpes), uma vez que o adquirir da infeção durante a gravidez pode ter graves consequências para o bebé.

No caso de doentes sujeitos a transplantes é também preciso haver um seguimento imunológico de diferentes vírus, bactérias e parasita, uma vez que estes ficam imunodeprimidos após o transplante, podendo vir a desenvolver alguma infeção⁶³.

8.6 Biologia Molecular

A deteção e identificação de microrganismos por técnicas de Biologia Molecular tem sido uma grande aposta a nível laboratorial devido à sua rapidez de resposta (principalmente em casos urgentes) através da pesquisa de partes do genoma.

8.6.1 GeneXpert® (Cepheid)

O aparelho faz uso de cartuchos que incluem todos os reagentes necessários para a lise da amostra, amplificação e deteção de genes de microrganismos utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (PCR em tempo real). Nalguns casos permite

também a detecção de genes de resistência⁷³. A colheita da amostra envolve a utilização de zaragatoas com meio de transporte específico.

São vários os microrganismos ou toxinas que podem ser identificados utilizando este aparelho, sendo alguns exemplos:

- o complexo *M. tuberculosis complex* e presença do gene de resistência à rifampicina: teste realizado em situações de urgência com forte suspeita ou quando o esfregaço é positivo. Desta forma, esta pesquisa permite evitar cadeias de transmissão e a administração da terapêutica mais correta⁷³;

- *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA): colheita de uma zaragatoa nasal para testes de rastreio de colonização em indivíduos de risco (internados);

- *Klebsiella* resistente a carbapenemases (KPC): colheita de zaragatoa retal para testes de rastreio de colonização em indivíduos de risco (internados). A pesquisa destas bactérias permite reduzir taxas de transmissão e de mortalidade;

- *Streptococcus agalactiae*: detecção feita em mulheres grávidas, uma vez que a infecção por esta bactéria tem elevadas implicações em termos de morbidade e mortalidade no recém-nascido;

- *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*: pesquisa em exsudados vaginais e uretrais de bactérias responsáveis por infecções sexualmente transmissíveis, para as quais outras áreas, como a serologia, por vezes não conseguem dar resposta;

- toxina de *Clostridium difficile*: a pesquisa deve ser feita em fezes diarreicas de indivíduos com idade superior a 65 anos, uma vez que esta é uma causa de comorbilidades após antibioterapia⁶³.

8.6.2 FilmArray® Torch (bioMérieux)

Utiliza painéis que pesquisam diversos agentes infecciosos (bactérias, fungos ou parasitas) mais associados ao tipo de infecção para os diferentes sistemas, tanto a nível respiratório superior ou inferior, meningites/encefalites, gastrointestinal ou hematológico.

Esta técnica utiliza um PCR *multiplex nested* que consegue fazer no mesmo aparelho a extração, purificação e amplificação dos genes dos diferentes microrganismos presentes na amostra. Primeiro é feito um PCR utilizando primers externos e de seguida um PCR com primers internos. Neste caso, é utilizada uma sonda de fluorescência LCGreen® Plus que emite fluorescência ao ser intercalada na dupla cadeia de DNA. Os resultados podem ser obtidos numa hora⁷⁴.

8.6.3 VitaPCR (Credo Diagnostics)

Utiliza a técnica de PCR em tempo real, permitindo a obtenção de um resultado em apenas 20 minutos. Através da colheita de uma zaragatoa, neste caso nasofaríngea, é capaz de detetar o vírus SARS-CoV-2. Esta determinação engloba a pesquisa de três alvos em simultâneo, um correspondente ao gene humano da β -globina, um gene específico da nucleocápside viral e uma sequência conservada do vírus. Apesar do aparelho possuir uma menor sensibilidade, pode ser utilizado em situações de rastreio e situações mais urgentes, uma vez que apresenta elevada especificidade e resultados bastante rápidos⁷⁵.

8.7 Virologia

Vírus são microrganismos intracelulares obrigatórios que dependem da célula hospedeira para se replicarem. Existem vírus cujo genoma é constituído por DNA (vírus herpes simplex) ou ácido ribonucleico (RNA) (HIV). O virião inclui o genoma envolvido pela cápside e, em alguns casos, um envelope⁴⁹. Estes podem ser transmitidos de diversas formas, como por exemplo através de aerossóis, fecal-oral, contacto sexual ou trauma⁶³.

O laboratório de Virologia encontra-se no HP e devido ao tempo ser limitado não houve a oportunidade de observar os procedimentos lá realizados.

Neste setor a pesquisa laboratorial ocorre de forma dirigida através da pesquisa de componentes virais (antígenos ou o genoma) ou pesquisa de anticorpos contra o vírus. Algumas amostras necessitam de passar primeiro por um processo de inativação. De seguida é realizada a extração e amplificação, que pode ser feita através de PCR em tempo real, no caso de se tratar de vírus de DNA, ou RT-PCR, no caso de se tratar de vírus de RNA. A amplificação engloba ciclos de aumento e diminuição da temperatura onde são utilizados primers específicos para o gene do vírus que pretendemos pesquisar, que se ligam à sequência de interesse e por hibridização permitem a obtenção de várias cópias do mesmo⁴⁹.

Outras técnicas bastante utilizadas são o FilmArray[®] Torch (bioMérieux) e técnicas imunocromatográficas ou imunoenzimáticas, quando se tenciona pesquisar os anticorpos.

Em algumas situações, como no caso do HIV, é ainda quantificada a carga viral de forma a permitir avaliar a evolução da doença e a monitorização da terapêutica e são utilizadas técnicas de sequenciação, que determinam a presença de resistências a antirretrovirais.

9. Caso Clínico n.º I de Microbiologia

Um indivíduo do sexo masculino de 20 anos deu entrada no serviço de Urgência com queixas de dor no pénis (com vários dias de evolução e agravamento recente), apresentando no último dia um corrimento uretral. Na avaliação clínica referia disúria, dor de 3 em 10 e encontrava-se com sinais vitais normais.

Com base nisto o clínico determinou a colheita de uma zaragatoa de exsudado uretral para despiste de infeções sexualmente transmissíveis e este foi medicado com terapêutica empírica.

A nível laboratorial a partir da zaragatoa do exsudado uretral foram feitas as sementeiras nos meios de cultura GS, VCAT 3 e CNA e depois o esfregaço corado pela coloração de Gram. Os meios foram incubados a 37°C em atmosfera capnófila e observados após 18 a 24 horas.

Na observação do esfregaço verificou-se a presença de diplococos de Gram negativo sugestivos de *Neisseria* spp. (Figura 22 A), fornecendo uma expectativa em relação ao microrganismo a ser recuperado através das culturas.

O único meio que permitiu o isolamento da bactéria de interesse foi o VCAT 3, uma vez que os restantes estavam contaminados com microbiota da zona urogenital.

As espécies de *Neisseria* spp. apresentam um crescimento lento, podendo demorar mais de 48 horas até serem detetadas em cultura. Como o indivíduo tinha uma terapêutica prévia fez com que demorasse ainda mais tempo a sua recuperação e visualização em placa. A persistência na obtenção da bactéria foi devida à observação do exame microscópico.

Posteriormente, foi inoculada em meio GS de forma a realizar-se o respetivo antibiograma (Figura 22 B).

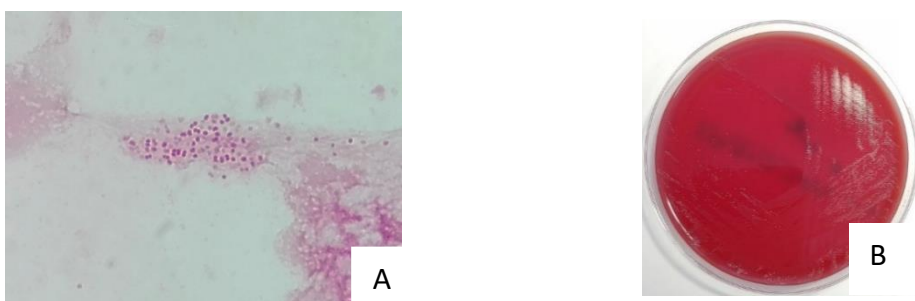


Figura 22 - A - Esfregaço corado pela coloração de Gram onde se observam diplococos de Gram negativo. Fotografia tirada no CHUC. B - Meio GS com colónias de *N. gonorrhoeae* que se apresentam esbranquiçadas, translúcidas e brilhantes. Fotografia tirada no CHUC.

Após o isolamento foi feita a identificação pela técnica de Maldi-TOF-MS de *Neisseria gonorrhoeae* e o respetivo antibiograma manual.

Para a sua realização foram utilizadas tiras de E-test em meio de cultura MHF e testados os antibióticos definidos pelo laboratório contra *N. gonorrhoeae* com base nas normas do EUCAST (Figura 23): azitromicina, ceftriaxona, ciprofloxacina, penicilina, espectinomicina e tetraciclina. Os meios foram incubados a 37°C durante 18 a 24 horas em atmosfera capnófila. Com base nos *breakpoints* estabelecidos pelo EUCAST foi possível averiguar a sensibilidade da bactéria a todos os antibióticos testados.

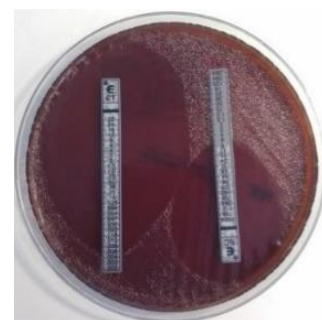


Figura 23 - Antibiograma manual através de E-test para espectinomicina e ceftriaxona. Fotografia tirada no CHUC.

Outra técnica que podia ter sido utilizada na identificação do microrganismo era a Biologia Molecular (GeneXpert®), porém esta apresenta a desvantagem de não permitir a realização do antibiograma.

Através da história clínica, sintomas, observação do esfregaço corado pela coloração de Gram e exame cultural foi possível fazer o diagnóstico de uretrite provocada pelo agente patogénico *Neisseria gonorrhoeae*.

Como a terapêutica empírica não teve resultado, a medicação foi alterada após o diagnóstico. Porém, foram desenvolvidas resistências aos antibióticos utilizados, sendo as possíveis causas a falha terapêutica ou o não tratamento do parceiro sexual.

Neisseria gonorrhoeae é um diplococo de Gram negativo aeróbio com crescimento fastidioso. Esta é a bactéria responsável pela gonorreia, uma infeção sexualmente transmissível.

A nível clínico a gonorreia é caracterizada pela emissão de uma descarga purulenta nos órgãos genitais e disúria (em indivíduos sintomáticos), sendo mais comum existirem mulheres assintomáticas do que homens.

Hoje em dia a gonorreia é considerada a segunda principal infeção sexualmente transmissível, com cerca de 87 milhões de novas pessoas infetadas por ano, e a sua prevalência deve-se ao cada vez maior número de estirpes multirresistentes⁴⁹.

10. Caso Clínico n.º2 de Microbiologia

Indivíduo do sexo feminino de 48 anos transferida de outro Hospital, deu entrada no serviço de Urgência do CHUC devido a cefaleia intensa occipital associada a vômito aquoso,

sem sinais de irritação meníngea e com episódios de delírio durante a noite. Para além disso, referia a ocorrência de sudorese intensa e rigidez na nuca. A mulher apresentou-se sempre consciente e orientada. Esta era portadora de HIV desde 2017, porém sem tratamento nem acompanhamento em consulta.

Com base nos sintomas e conhecimento da presença da infeção por HIV, suspeitou-se de meningite fúngica por *Cryptococcus* spp. A mulher foi internada no serviço de Infeciologia e foram colhidos os produtos biológicos urina, sangue e LCR.

A urina foi colhida e processada de acordo com o mencionado no produto biológico “Urina” e como não apresentava quaisquer alterações significativas não se procedeu a exame cultural.

Em relação ao sangue foram colhidas duas garrafas de hemocultura seguidas do tubo de gel, tubo de citrato e tubo de EDTA K₃. O procedimento para as garrafas de hemocultura foi de acordo com o mencionado no produto biológico “Sangue”, tendo apenas positivado uma delas. A partir desta procedeu-se ao esfregaço corado pela coloração de Gram e à inoculação do meio GS, que permaneceu na estufa a 37°C com atmosfera capnófila durante 18 a 24 horas.

Os tubos de gel, citrato e EDTA K₃ foram utilizados para as determinações bioquímicas e serológicas, de hemostase e hemograma com leucograma, respetivamente. Os parâmetros da hemostase e do hemograma não apresentaram alterações significativas.

O LCR foi colhido e processado de acordo com o descrito em “Líquido cefalorraquidiano (LCR)” e foi analisado em termos microbiológicos, bioquímicos e citológicos. A nível microbiológico, a partir do sedimento obtido pela centrifugação do LCR foi realizado o esfregaço corado pela coloração de Gram e inoculados os meios GS, PVX e BHI, que foram colocados na estufa a 37°C em atmosfera capnófila durante 18 a 24 horas.

Devido a ser uma situação de emergência e ao facto da obtenção dos resultados através de exame cultural ser um processo demorado, foram realizadas técnicas de Biologia Molecular utilizando o FilmArray[®] Torch (BioMérieux). Neste foi colocado o painel para meningites/encefalites (requer no mínimo 200µL de LCR) e foi feito um PCR *multiplex nested*, que detetou um microrganismo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* numa hora.

É sempre necessária a realização dos procedimentos clássicos para fazer o diagnóstico definitivo.

Em relação aos resultados obtidos para as diferentes amostras verificamos que na análise do esfregaço da hemocultura foram observadas células leveduriformes sugestivas de

Cryptococcus ssp.. O exame microscópico foi confirmado pelo exame cultural onde cresceu um microrganismo identificado pela técnica Maldi-TOF-MS como *Cryptococcus neoformans*.

A bioquímica sanguínea permitiu confirmar que a mulher apresentava um estado de infecção generalizada, através dos elevados níveis de proteína C reativa e procalcitonina.

A observação microscópica do LCR permitiu visualizar alguns leucócitos (10-25/campo) e algumas células leveduriformes com cápsula a gemular (10-25/campo) (Figura 24 A). No exame cultural foi detetado o crescimento de um microrganismo, identificado pelo Maldi-TOF-MS como *Cryptococcus neoformans* (Figura 24 B).

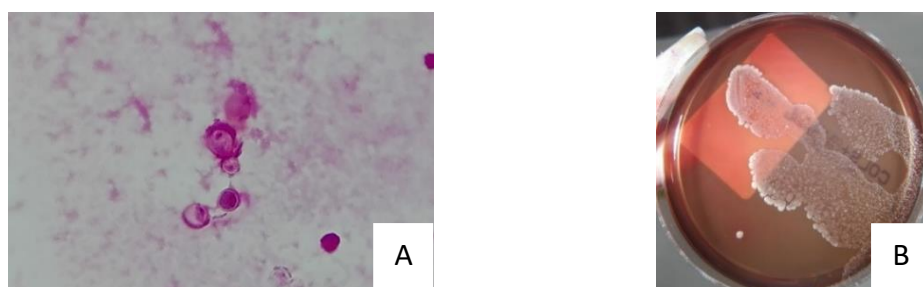


Figura 24 - A - Esfregaço corado pela coloração de Gram onde é possível observar células leveduriformes a gemular e respectivas cápsulas. Fotografia tirada no CHUC. B - Sementeira por inundação de LCR em PVX, onde é possível observar *C. neoformans* com colónias esbranquiçadas, mucóides e brilhantes. Fotografia tirada no CHUC.

A bioquímica do LCR analisou três parâmetros: a glicose, as proteínas e a LDH. Neste caso, a glicose apresentava-se normal e as proteínas e a LDH estavam aumentadas. Em relação à análise citológica, esta determinou um predomínio de mononucleares.

Estas informações permitem confirmar a existência de uma possível infecção devido ao aumento do nível proteico e LDH e excluir a infecção por bactérias, uma vez que nestes casos há consumo de glicose e um predomínio de polimorfonucleares⁷⁶.

A nível serológico foram detetados anticorpos contra HIV. A amostra foi enviada para o HP para se proceder à confirmação, avaliação do tipo de HIV e quantificação da carga viral de modo a seguir a evolução da patologia e do tratamento. No HP foi identificado o HIV tipo I (HIV-1).

Desta forma foi feito o diagnóstico de meningite criptocócica secundária à infecção por HIV e a paciente teve alta para o domicílio, com consulta marcada em Imunodeficiência e medicação antirretroviral e contra *C. neoformans* prescrita.

Cryptococcus neoformans é um fungo leveduriforme cosmopolita encontrado em solos contaminados com excrementos de pombo. Este é transmitido através da inalação de esporos em aerossóis.

O fungo apresenta como principal fator de virulência uma cápsula polisacarídica, que permite a evasão ao Sistema Imune, inibe a fagocitose e suprime as defesas do organismo. As pessoas saudáveis têm a capacidade de eliminar a infecção tornando-a limitada, sendo os indivíduos muitas vezes assintomáticos. Em situações de imunodepressão *C. neoformans* pode apresentar-se como um oportunista e em casos de criptococose disseminada esta pode ser fatal, caso a infecção não seja tratada. Portadores de HIV são um exemplo de indivíduos mais suscetíveis a este tipo de infecção.

A primoinfecção ocorre a nível pulmonar, sendo o fungo disseminado para a circulação através de macrófagos. Este apresenta um neurotropismo acentuado podendo ser responsável por meningoencefalites. A clínica é caracterizada por febre, dor de cabeça, distúrbios visuais e alterações neurológicas.

O vírus da imunodeficiência humana pertence à família *Retroviridae* e inclui dois tipos: o tipo 1 (HIV-1) e o tipo 2 (HIV-2).

Em relação ao HIV-1, este tem a capacidade de infetar linfócitos T CD4+, sendo a principal forma de transmissão o contacto sexual desprotegido. Após a infecção primária o vírus atua no sentido de aumento de replicação e consequentemente da carga viral, e diminuição dos linfócitos T CD4+. A implicação é o aumento da destruição imunológica, tornando o indivíduo mais suscetível a infeções oportunistas.

A terapêutica envolve a administração de antirretrovirais (TARV), cujo principal objetivo é a supressão da replicação viral, permitindo a recuperação imunológica.

Em algumas situações é através da deteção de infeções oportunistas, como o caso da criptococose, que é descoberta a presença da infecção por HIV⁴⁹.

I I. Bioquímica

Na Bioquímica são avaliados parâmetros que permitem analisar a correta performance de diferentes partes do organismo: função renal, pancreática, intestinal, cardíaca, hepática, os diferentes metabolismos ou ainda o balanço eletrolítico. Os principais produtos biológicos analisados são o soro e a urina, e devido a ser processado um tão grande número de amostras, esta é uma das áreas que apresenta maior nível de automatização.

A maioria dos parâmetros é determinada utilizando os aparelhos Alinity c (Abbott) que utilizam técnicas fotométricas e potenciométricas e, para além disso, são feitas outras determinações, tais como:

- avaliação sumária da urina, que inclui os parâmetros bioquímicos (pH, proteínas, bilirrubina, entre outros) e a análise do sedimento (leucócitos, cilindros, cristais, entre outros);
- hemoglobina glicada através de HPLC e possíveis variantes de hemoglobina;
- pesquisa de sangue oculto nas fezes por técnicas de imun química, realizadas em amostras de indivíduos com mais de 45 anos como forma de rastreio de cancro do colón;
- *lateral flow assay* para pesquisa da hormona β -gonadotrofina coriónica humana, vírus (dengue), parasitas (*Plasmodium* spp.), multidrogas ou mononucleose;

- pesquisa de vitaminas e metabolitos através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massa (HPLC-MS);

- caracterização da composição de cálculos renais, através da avaliação da percentagem de carbonatos, cálcio, oxalato, fosfato, magnésio, ácido úrico e cistina (Figura 25);

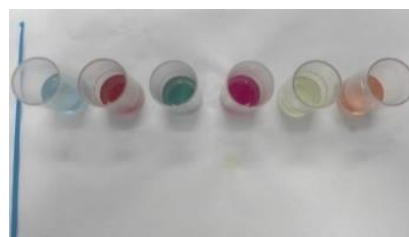


Figura 25 - Processo manual para caracterização da composição de cálculos renais. Fotografia tirada no CHUC.

- utilizando sangue arterial são feitas gasometrias, onde se avaliam os gases sanguíneos (pressão parcial de O_2 e CO_2), pH e eletrólitos (potássio, sódio, cálcio e cloreto) presentes;

- pesquisa e quantificação de metais, como o zinco, alumínio ou cobre, por técnicas de Espectrofotometria de Absorção Atómica.

No HP foi possível contactar com outras técnicas, entre elas:

- teste do suor, para pesquisa de cloretos quando se suspeita de Fibrose Quística;
- esteatócrito, que permite a avaliação da gordura fecal.

12. Imunologia

A Imunologia permite o estudo do sistema imunológico associado às respetivas interações com o próprio organismo ou substâncias externas a este. Nesta área podem ser estudadas uma grande panóplia de patologias, tais como gamopatias monoclonais, reações alérgicas ou de hipersensibilidade, imunodeficiências, doenças autoimunes, entre outras.

A área de Imunologia no CHUC inclui dois setores distintos, o da Autoimunidade e o da Imunologia. As principais amostras utilizadas são o soro, o LCR e a urina de 24 horas. Existindo uma grande variedade de técnicas

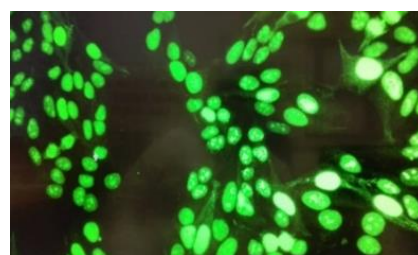


Figura 26 - Exemplo de padrão de fluorescência observado utilizando a técnica de IFI. Fotografia tirada no CHUC.

realizadas que são mencionadas nas Tabelas viii e ix, juntamente com alguns exemplos dos parâmetros avaliados.

Tabela viii - Técnicas e exemplos de parâmetros avaliados no setor da Autoimunidade

Setor da Autoimunidade

ELISA	Pesquisa de anticorpos anti-cardiolipina, anti- β 2-glicoproteína, anti-histonas, anti-fator intrínseco
IFI	Pesquisa de anticorpos antinucleares e citoplasmáticos através dos diferentes padrões de fluorescência apresentados (Figura 26)
Immunoblotting	Pesquisa de anticorpos associados a síndromas neurológicos, hepáticos, miosites e do tecido conjuntivo
Imunoensaio Fluoroenzimático (FEIA)	Pesquisa de anticorpos anti-transglutaminase, anti-gliadina, anti-dsDNA, anti-mieloperoxidase, anti-proteinase 3
Quimioluminescência	Screening de anticorpos anti-antígenos nucleares (ENA7): anti-SSA (Ro60), anti-Ro52/TRIM21, anti-SSB (La), anti-Sm, anti-nRNP, anti-Scl-70 e anti-Jo-1
Radioimunoensaio (RIA)	Pesquisa de anticorpos anti-dsDNA, anti-insulina

Tabela ix - Técnicas e exemplos de parâmetros avaliados no setor da Imunologia

Setor da Imunologia

Eletroforese e Imunofixação	Realizado em proteínas do soro (albumina, α 1, α 2, β e γ), urina (proteínas de origem tubular, albumina e proteínas de origem glomerular) ou LCR (bandas oligoclonais)
FEIA	Pesquisa de IgE específicas para alérgenos ambientais, animais ou alimentares
HPLC-MS	Quantificação de imunossupressores (everolimus)
Nefelometria	Pesquisa de albumina, imunoglobulinas, subclasses de IgG, cadeias leves livres, fator reumatóide
Turbidimetria	Pesquisa de imunoglobulinas A, G, E e M, cadeias leves kappa e lambda, complemento C3 e C4, subclasses de IgA, apoA1, apoB100
Técnicas Manuais	Pesquisa de Crioglobulinas, técnica de Waaler-Rose

13. Conclusão

As Análises Clínicas apresentam-se como uma área em constante mudança e evolução que necessita de estudo contínuo, uma vez que são constantemente feitas novas descobertas e desenvolvidas novas tecnologias.

A realização deste estágio permitiu perceber a rotina dentro de um laboratório hospitalar e também participar de forma ativa na realização das muitas técnicas executadas nos diferentes setores. Desta forma, para além de consolidar todo o conhecimento dado durante o curso pude também aprender novas temáticas, como as abordadas no setor da Autoimunidade.

Durante o mesmo consegui presenciar a necessidade da interligação e cooperação entre as diversas áreas e os diferentes profissionais, de modo a serem obtidos os resultados mais corretos e no menor tempo possível. Sendo notória a crescente automatização devido ao elevado número de amostras.

Apesar do esforço realizado pelas minhas orientadoras e responsáveis dos setores, não houve, por vezes, oportunidade para visualizar a dinâmica ou a execução das técnicas devido ao laboratório englobar tantas áreas diferentes e ao tempo limitado. Contudo foi sempre explicado o modo de funcionamento, as técnicas utilizadas e enquadrado o tipo de parâmetros avaliados.

Um dos aspetos que acho que ajudaria a complementar toda esta experiência teria sido a formação para realização de colheitas aquando do curso de Análises Clínicas, de modo a ter a oportunidade de praticar em contexto laboratorial.

Considero esta uma experiência bastante enriquecedora a nível profissional e inter-relacional que me permitiu integrar nos procedimentos laboratoriais e contactar com pessoas com outro tipo de formações, funções e conhecimentos tão diversos.

14. Bibliografia

1. KARKALOUSOS P.; EVANGELOPOULOS A. - Quality Control in Clinical Laboratories. *Applications and Experiences of Quality Control*. Published online 2011. doi:10.5772/15865
2. HATTON C. S. R. et al. - *Haematology Lecture Notes*. Vol 504. 9th ed.; 2013. doi:10.1038/504008a
3. FOLEY A. - Optimizing Hematology Analysis: When Physical Prototypes Fail, Simulation Provides The Answers. *COMSOL NEWS*. Published online 2014:24-27.
4. KARAKOCHUK C. D. et al. - Measurement and interpretation of hemoglobin concentration in clinical and field settings: a narrative review. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2019;1450(1):126-146. doi:10.1111/nyas.14003
5. ADAN A et al. - Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2017;37(2):163-176. doi:10.3109/07388551.2015.1128876
6. ROCCAFORTE V. et al. - Use of the reticulocyte channel warmed to 41 °C of the XN-9000 analyzer in samples with the presence of cold agglutinins. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*. 2021;43(2):147-155. doi:10.1016/j.htct.2020.01.004
7. SHIH H.; WU C.; LIN S. - Physiology and pathophysiology of renal erythropoietin-producing cells. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2018;117(11):955-963. doi:10.1016/j.jfma.2018.03.017
8. RODAK B. F.; CARR J. H. - *Clinical Hematology Atlas*. 5^a. (ELSEVIER, ed.); 2017.
9. CASCIO M. J.; DELOUGHERY T. G. - Anemia: Evaluation and Diagnostic Tests. *Medical Clinics of North America*. 2017;101(2):263-284. doi:10.1016/j.mcna.2016.09.003
10. PROVAN D. et al. - *Oxford Handbook of Clinical Haematology*. 2^a; 2009. doi:10.1093/med/9780199227396.001.0001
11. JULUISSON G.; HOUGH R. - Leukemia. *Progress in Tumor Research*. 2016;43:87-100. doi:10.1159/000447076
12. HOLINSTAT M. - Normal platelet function. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2017;36(2):195-198. doi:10.1007/s10555-017-9677-x
13. OLSHAKER J. S.; JERRARD D. A. - The erythrocyte sedimentation rate. *Journal of Emergency Medicine*. 1997;15(6):869-874. doi:10.1016/S0736-4679(97)00197-2
14. TANEJA N. - Erythrocyte Sedimentation Rate – Is There a Need for a Fasting Blood Sample? *Medical Journal Armed Forces India*. 1997;53(1):72. doi:10.1016/s0377-1237(17)30655-x
15. FURIE B.; FURIE B. C. - Mechanisms of thrombus formation. *The New England Journal of Medicine*. 2008;359(9):938-949. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18753650>

16. FRANCO R. F. - Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. In: *Simpósio: Hemostasia e Trombose.* ; 2001:229-237.
17. BRONIC A. et al. - Croatian society of medical biochemistry and laboratory medicine: National recommendations for blood collection, processing, performance and reporting of results for coagulation screening assays prothrombin time, activated partial thromboplastin time, thr. *Biochemia Medica.* 2019;29(2):1-22. doi:10.11613/BM.2019.020503
18. BONAR R. A.; LIPPI G.; FAVALORO E. J. - *Overview of Hemostasis and Thrombosis and Contribution of Laboratory Testing to Diagnosis and Management of Hemostasis and Thrombosis Disorders.* Vol 1646.; 2017. doi:10.1007/978-1-4939-7196-1_1
19. LEVY J. H. et al. - Clinical use of the activated partial thromboplastin time and prothrombin time for screening: A review of the literature and current guidelines for testing. *Clinics in Laboratory Medicine.* 2014;34(3):453-477. doi:10.1016/j.cll.2014.06.005
20. FUNK C. et al. - Reptilase-R-A New Reagent in Blood Coagulation. *British Journal of Haematology.* 1971;(factor I).
21. ASH. - 2012 Clinical Practice Guideline on the Evaluation and Management of von Willebrand Disease (VWD). *American Society of Hematology.* 2012;(08):8.
22. CAFÉ A. et al. - Haemophilia A: Health and economic burden of a rare disease in Portugal. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* 2019;14(1):1-11. doi:10.1186/s13023-019-1175-5
23. ROGERS H. J.; NAKASHIMA M. O.; KOTTKE-MARCHANT K. - *Hemostasis and Thrombosis.* Third Edit. Elsevier Inc.; 2018. doi:10.1016/B978-0-323-47913-4.00002-1
24. MOLHOEK J. E.; GROOT P. G.; URBANUS R. T. - The Lupus Anticoagulant Paradox. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis.* 2018;44(5):445-452. doi:10.1055/s-0037-1606190
25. FAVALORO E. J.; LIPPI G. - Lupus anticoagulant testing: activated partial thromboplastin time (aptt) and silica clotting time (sct). In: *Hemostasis and Thrombosis: Methods and Protocols.* Vol 1646. ; 2017:177-183. doi:10.1007/978-1-4939-7196-1
26. JOHNSON E. D.; SCHELL J. C.; RODGERS G. M. - The D-dimer assay. *American Journal of Hematology.* 2019;94(7):833-839. doi:10.1002/ajh.25482
27. KOMAROMI I.; BAGOLY Z.; MUSZBEK L. - Factor XIII: Novel structural and functional aspects. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2011;9(1):9-20. doi:10.1111/j.1538-7836.2010.04070.x
28. WARKENTIN T. E. et al. - Laboratory testing for heparin-induced thrombocytopenia: a conceptual framework and implications for diagnosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2011;9(12):2498-2500. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04536.x

29. JUNQUEIRA D. R.; ZORZELA L. M.; PERINI E. - Unfractionated heparin versus low molecular weight heparins for avoiding heparin-induced thrombocytopenia in postoperative patients. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2017;(4). doi:10.1002/14651858.CD007557.pub3
30. VANDIVER J. W.; VONDRACEK T. G. - A comparative trial of anti-factor Xa levels versus the activated partial thromboplastin time for heparin monitoring. *Hospital practice*. 2013;41(2):16-24. doi:10.3810/hp.2013.04.1022
31. TANAKA K. A. *et al.* - Rotational thromboelastometry (ROTEM)-based coagulation management in cardiac surgery and major trauma. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*. 2012;26(6):1083-1093. doi:10.1053/j.jvca.2012.06.015
32. ARSHAM M. S.; BARCH M. J.; LAWCVW H. J. - *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. Vol 4. Fourth. The Association of Genetic Technologists; 2017.
33. GONZALES P. R.; MIKHAIL F. M. - Diagnostic and Prognostic Utility of Fluorescence In situ Hybridization (FISH) Analysis in Acute Myeloid Leukemia. *Current Hematologic Malignancy Reports*. 2017;12(6):568-573. doi:10.1007/s11899-017-0426-6
34. KWAAN H. C.; CULL E. H. - The coagulopathy in acute promyelocytic leukaemia - What have we learned in the past twenty years. *Best Practice and Research: Clinical Haematology*. 2014;27(1):11-18. doi:10.1016/j.beha.2014.04.005
35. PANDOLFI P. P. - Oncogenes and tumor suppressors in the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Human Molecular Genetics*. 2001;10(7):769-775. doi:10.1093/hmg/10.7.769
36. KWAAN H. C. - The unique hemostatic dysfunction in acute promyelocytic leukemia. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2014;40(3):332-336. doi:10.1055/s-0034-1370792
37. WILSON M. L. - General principles of specimen collection and transport. *Clinical Infectious Diseases*. 1996;22(5):766-777. doi:10.1093/clinids/22.5.766
38. DELOST M. D. - *Introduction to Diagnostic Microbiology for the Laboratory Sciences*; 2015. http://samples.jbpub.com/9781284032314/9781284032314_CH01_001_016.pdf
39. BARTHOLOMEW J. W.; MITTWER T. - The Gram stain. *American Society for Microbiology*. 1952;16. doi:10.1097/00013542-199704000-00006
40. LibreTexts. - *Book : Microbiology*; 2021.
41. BUXTON R. - Blood Agar Plates and Hemolysis Protocols. *American Society for Microbiology*. 2005;(September 2005):1-9.
42. Anvisa. - Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. 2004;IV:1-66. http://www.anvisa.gov.br/servicosade/microbiologia/mod_4_2004.pdf

43. FONSECA A. B. *et al.* - Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia. *Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge*. Published online 2004:1-193.
44. MARCH S. B.; RATMAN S. - Sorbitol-MacConkey Medium for Detection of *Escherichia coli* O157:H7 Associated with Hemorrhagic Colitis. *Journal of clinical microbiology*. 1986;23(5):869-872. [papers2://publication/uuid/6E0D2757-9458-4FA5-AECA-A83F08D0EAF5](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3111111/)
45. CHAPIN K.; DOERN G. V. - Selective media for recovery of *Haemophilus influenzae* from specimens contaminated with upper respiratory tract microbial flora. *Journal of Clinical Microbiology*. 1983;17(6):1163-1165. doi:10.1128/jcm.17.6.1163-1165.1983
46. HENRY D. *et al.* - Comparison of isolation media for recovery of *Burkholderia cepacia* complex from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999;37(4):1004-1007. doi:10.1128/jcm.37.4.1004-1007.1999
47. AJELLO L. - Cultural methods for human pathogenic fungi. *Journal of Chronic Diseases*. 1957;5.
48. WASHINGTON J. A. - Initial Processing for Cultures of Specimens. *Laboratory Procedures in Clinical Microbiology*. Published online 1981:91-126. doi:10.1007/978-1-4684-0118-9_3
49. MURRAY P. R.; ROSENTHAL K. S.; PFALLER M. A. - *Medical Microbiology*. Vol 50.; 2016. doi:10.1002/jobm.201090014
50. Ministério da Saúde. - *Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial Da Salmonella Spp*. 1ª.; 2011.
51. TILLE P. M. - *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 13th ed.; 2014.
52. DINGLE T. C.; BUTLER-WU S. M. - MALDI-TOF mass spectrometry for microorganism identification. *Clinics in Laboratory Medicine*. 2013;33(3):589-609. doi:10.1016/j.cll.2013.03.001
53. TRUANT A. L. *et al.* - *Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology*. 2ª.; 2016. doi:10.1002/9781119021872
54. ROSA R. *et al.* - Evaluation of the new Sysmex UF-5000 fluorescence flow cytometry analyser for ruling out bacterial urinary tract infection and for prediction of Gram negative bacteria in urine cultures. *Clinica Chimica Acta*. 2018;484(May):171-178. doi:10.1016/j.cca.2018.05.047
55. FONTANA C. *et al.* - A novel culturing system for fluid samples. *Medical Science Monitor*. 2009;15(2):55-60.
56. CETINKAYA A. - An Overview to the Treatment of Bacterial Infections of Urinary Tract. *Urinary Tract Infections & Treatment*. Published online 2018:1-8.
57. MAY O. W. - Urine Collection Methods in Children: Which is the Best? *Nursing Clinics of North America*. 2018;53(2):137-143. doi:10.1016/j.cnur.2018.01.001

58. PANCHOLI P. *et al.* - Multicenter evaluation of the accelerate PhenoTest BC kit for rapid identification and phenotypic antimicrobial susceptibility testing using morphokinetic cellular analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2018;56(4):1-21. doi:10.1128/JCM.01329-17
59. HALL K. K.; LYMAN J. A. - Updated review of blood culture contamination. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006;19(4):788-802. doi:10.1128/CMR.00062-05
60. WEINSTEIN M. P. - Current blood culture methods and systems: Clinical concepts, technology, and interpretation of results. *Clinical Infectious Diseases*. 1996;23(1):40-46. doi:10.1093/clinids/23.1.40
61. VANDEPITTE J. *et al.* - *Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology*. 2^a.; 2003. www.ijstr.org
62. DAMAS C.; AMORIM A.; GOMES I. - Fibrose quística: Revisão. *Revista Portuguesa de Pneumologia*. 2008;XIV.
63. TILLE P. M. - *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. Elsevier; 2017.
64. MIRANTE C. *et al.* - Comparing concentration methods: Parasitrap® versus Kato-Katz for studying the prevalence of helminths in Bengo province, Angola. *African Health Sciences*. 2016;16(3):698-703. doi:10.4314/ahs.v16i3.9
65. SIDDIQI S. H.; RUSCH-GERDES S. - MGIT Procedure Manual. *FIND*. Published online 2006. http://www.finddiagnostics.org/export/sites/default/resource-centre/find_documentation/pdfs/mgit_manual_nov_2007.pdf
66. MARTINEZ-SANCHEZ L. *et al.* - Utility of the BACTEC Myco/F lytic medium for the detection of mycobacteria in blood. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2000;38(4):223-226. doi:10.1016/S0732-8893(00)00202-9
67. BD. - *Manual of Microbiological Culture Media*. 2^a.; 2009.
68. YOLKEN R. H.; STOPA P. J. - Enzyme-linked fluorescence assay: ultrasensitive solid-phase assay for detection of human rotavirus. *Journal of Clinical Microbiology*. 1979;10(3):317-321. doi:10.1128/jcm.10.3.317-321.1979
69. WANG C. *et al.* - Chemiluminescent immunoassay and its applications. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. 2012;40(1):3-10. doi:10.1016/S1872-2040(11)60518-5
70. SMIRNOVA E. A. *et al.* - Current Methods of Human and Animal Brucellosis Diagnostics. *Advances in Infectious Diseases*. 2013;03(03):177-184. doi:10.4236/aid.2013.33026
71. Charles River Laboratories. - Serologic Methods Manual. *360 Diagnostics TM*. Published online 2016. <https://www.criver.com/sites/default/files/resources/SerologicMethodsManual.pdf>
72. WARD S. *et al.* - Clinical testing for COVID-19. *American Academy of Allergy, Asthma & Immunology*. 2020;(January).

73. SASIKUMAR C. *et al.* - The role of genexpert in the diagnosis of mycobacterium tuberculosis. *Advances in Respiratory Medicine*. 2020;88(3):184-188. doi:10.5603/ARM.2020.0102
74. PORITZ M. A. *et al.* - Filmarray, an automated nested multiplex PCR system for multi-pathogen detection: Development and application to respiratory tract infection. *PLoS ONE*. 2011;6(10). doi:10.1371/journal.pone.0026047
75. FOURNIER P. *et al.* - Contribution of VitaPCR SARS-CoV-2 to the emergency diagnosis of COVID-19. *Journal of Clinical Virology*. 2020;133(January). doi:10.1016/j.jcv.2020.104682
76. SEEHUSEN D. A.; REEVES M. M.; FOMIN D. A. - Cerebrospinal fluid analysis. *American Family Physician*. 2003;68(6):1103-1108.

15. Anexos

Anexo 1: Autorização para uso de imagem



rendrik franco <rendri@hotmail.com>

ter, 30/03/2021 18:32

Para: Você



Prezada Patrícia,

Obrigado pela mensagem.

Escrevi este capítulo há tanto tempo, fico apenas em dúvida se a imagem que quer utilizar (não sei exatamente qual seria) ainda seria válida à luz dos conceitos atuais. De qualquer forma, de minha parte não haveria problema algum.

Cordiais saudações,

R. Franco

Anexo 2: Coloração de Gram

A Coloração de Gram envolve a adição de um corante primário, cristal de violeta, que penetra a parede bacteriana e cora todas as bactérias de roxo. De seguida, é adicionado o mordente, soluto de lugol, que forma um complexo com o primeiro corante e fica retido dentro das bactérias. A adição do diferenciador, álcool-acetona, para além de eluir os lípidos da membrana externa consegue atravessar a fina camada de peptidoglicano retirando a coloração às bactérias de Gram negativo. Nas bactérias de Gram positivo este não tem ação devido à espessa parede de peptidoglicano. Por fim, é adicionado o segundo corante, safranina, que cora todas as bactérias que não foram coradas.

Utilizando esta técnica conseguimos obter uma distinção entre bactérias de Gram positivo que coram de roxo e bactérias de Gram negativo que coram de rosa.

Anexo 3: Fundamento do aparelho Accelerate PhenoTest[®] BC (Accelerate Diagnostics)

Em primeiro lugar é feita uma electrofiltração em gel, de forma a limpar a amostra de restos celulares, sais ou proteínas, obtendo apenas os microrganismos presentes. Sobre estes é aplicado um campo elétrico e utilizado um gel com poros mais pequenos que o diâmetro dos microrganismos.

Posteriormente é realizada a técnica FISH, utilizando uma mistura de sondas alvo marcadas com fluorescência (verde) que através de permeabilização se ligam ao RNA do ribossoma. É também utilizada uma sonda universal (vermelha) que se liga a todas as bactérias ou fungos clinicamente relevantes. Isto permite a quantificação e identificação dos organismos alvo, que apresentem tanto a sonda alvo como a sonda universal.

Após a identificação são testados uma seleção de antibióticos através de análise celular morfocinética, que permite verificar o crescimento e multiplicação do microrganismo (inclui morfologia, taxa de divisão, entre outras). E com base nestas características são extrapoladas as CIM para cada antibiótico testado.