



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Antónia Teixeira Diniz

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientada pela Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa e pela Dra. Cristiana Canha e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Antónia Teixeira Diniz

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientada pela Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa e pela Dra. Cristiana Canha e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Estágio realizado no Serviço de Patologia Clínica
do Hospital Universitário de Coimbra.

Setembro de 2022

Agradecimentos

Primeiramente queria agradecer à Dra. Cristiana Canha e à Dra. Alice Mendes por me ter recebido de braço abertos e por toda a disponibilidade e orientação prestada durante o estágio.

Agradeço ao Dr. Fernando Rodrigues por ter permitido a realização deste estágio no serviço de Patologia Clínica no Hospital da Universidade de Coimbra.

Agradeço à Professora Doutora Maria do Céu Sousa a quem estou muito grata pela sua disponibilidade e por me ter ajudado a escrever o relatório de forma crítica.

Agradeço também a todos os professores e colegas que se cruzaram comigo pelos ensinamentos e pelo apoio prestados ao longo destes dois anos de mestrado.

Por último, o meu eterno agradecimento aos meus pais, as pessoas mais importantes na minha vida, por toda o esforço e pelo apoio que sempre me deram e que tornaram possível o meu ingresso neste mestrado. Agradeço-lhes também toda a força que sempre me deram para conseguir alcançar os meus objetivos e não desistir deles em momento algum.

Índice

Abreviaturas	11
Resumo	13
Abstract	13
1. Caracterização do laboratório	15
2. Fases do processo analítico	16
3. Controlo de qualidade.....	16
3.1. Controlo de qualidade interno.....	17
3.2. Controlo de qualidade externo	17
4. Imunologia.....	18
5. Bioquímica.....	19
6. Hematologia.....	21
6.1. Hemograma	21
6.1.1. Eritrograma	21
6.1.2. Série eritrocitária: Alterações quantitativas	23
6.2. Leucograma	24
6.3. Metodologias associadas ao Hemograma.....	25
6.3.1. Citometria de fluxo.....	25
6.3.2. Impedância com focagem Hidrodinâmica	26
6.3.3. Velocidade de Sedimentação	27
6.3.4. Esfregaço de sangue periférico	27
6.4. Serie eritrocitária: alterações morfológicas	28
6.5. Serie leucocitária: morfologia.....	32
6.5.1. Serie leucocitária: alterações morfológicas	34
6.6. Hemóstase	35
6.6.1. Metodologias associadas à Hemostase	36
6.6.2. Testes de <i>screening</i>	37
6.6.2.1. O tempo de Protrombina (TP).....	37
6.6.2.2. Tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPa).....	37
6.6.2.3. Testes de mistura.....	38
6.6.2.4. Fibrinogénio.....	38
6.6.2.5. Teste de fibrinólise: D-dímeros	38
7. Microbiologia	39
7.1. Meios de cultura	39
7.1.1. Meios líquidos	40
7.1.2. Meios Sólidos	40
7.2. Técnicas de inoculação	43
7.3. Exame microscópico	43
7.4. Identificação dos microrganismos	44
7.4.1. Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos	44
7.4.1.1. TSA manual.....	44
7.4.1.2. TSA automático.....	45
7.5. Amostras biológicas.....	45

7.5.1. Urina	45
7.5.2. Fezes	46
7.5.3. Sangue	47
7.5.4. Cateter.....	48
7.5.5. Produtos do trato respiratório	49
7.5.6. Exsudados vaginais e exsudados uretrais	49
7.5.7. Exsudados de feridas	50
7.5.8. Líquido Cefalorraquidiano (LCR)	51
7.5.9. Outros líquidos.....	51
7.6. Micobactérias	52
7.6.1. Processamento das amostras	52
7.6.2. Exame microscópico.....	53
7.6.3. Exame cultural	53
7.6.4. Identificação e TSA.....	54
7.7. Fungos	54
7.8. Virologia	55
7.9. Serologia.....	56
7.9.1. Imunofluorescência indireta	56
7.9.2. Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).....	57
7.9.3. Ensaio de fluorescência enzimática (ELFA)	57
7.9.4. Ensaio de quimioluminescência (CLIA)	57
7.9.5. Rosa de Bengala	58
7.9.6. Reação de Wright.....	58
7.9.7. Rapid Plasma Reagin (RPR).....	58
7.9.8. Treponema Passive Particle Agglutination (TP-PA)	59
7.10. Parasitologia.....	59
7.10.1. Amostras Vaginais	59
7.10.2. Sangue.....	60
8. Casos Clínicos	60
9. Conclusão.....	69
10. Bibliografia	71
11. Anexos	75

Lista de Tabelas

Tabela 1: Parâmetros analíticos e respectivos métodos utilizados no laboratório de imunologia.	18
Tabela 2: Principais parâmetros analíticos e respectivas metodologias utilizadas no laboratório da autoimunidade.....	19
Tabela 3: Principais parâmetros analíticos e respectivos métodos utilizados no setor de bioquímica.....	20
Tabela 4 : Principais etiologias clínicas relacionadas com leucocitose.....	25
Tabela 5: Diferentes tipos de alterações morfológicas eritrocitárias encontradas num esfregaço de sangue periférico: Eliptócitos; Drepanócitos e Esferócitos..	29
Tabela 5.1: Diferentes tipos de alterações morfológicas eritrocitárias encontradas num esfregaço de sangue periférico: Células em alvo; Equinócitos; Esquizócitos e Dacriocitos..	30
Tabela 6: Classificação dos diferentes meios de cultura utilizados em microbiologia.....	40
Tabela 7: Resultados dos parâmetros da análise Bioquímica.....	77
Tabela 8: Critérios para o diagnóstico da Diabetes.....	77
Tabela 9: Resultados laboratoriais obtidos no hemograma.....	78
Tabela 10: Resultados laboratoriais obtidos no leucograma.....	78
Tabela 11: Resultados laboratoriais obtidos para o estudo da hemostase.....	78
Tabela 12: Resultados dos parâmetros obtidos da análise bioquímica.....	80
Tabela 13: Resultados laboratoriais obtidos no hemograma e leucograma.....	81
Tabela 14: Análise bioquímica e citológica do LCR.....	81

Lista de Figuras

Figura 1: Eritrócitos com ponteados basófilos.....	31
Figura 2: Eritrocito contendo corpúsculo de Howell-Jolly.	31
Figura 3: Eritrocito contendo corpúsculo de Pappenheimer.....	31
Figura 4: (A) Rouleaux eritrocitários; (B) Aglutinação eritrocitária.....	32
Figura 5: Morfologia das diferentes populações de leucócitos num esfregaço de sangue periférico. (A) Morfologia representativa de neutrófilos; (B) Morfologia representativa de eosinófilos; (C) Morfologia representativa de basófilos; (D) Morfologia representativa de monócitos; (E) Morfologia representativa de linfócitos.....	33
Figura 6: Neutrófilo hipersegmentado.....	34
Figura 7: Neutrófilo com corpo de Döhle.....	34
Figura 8: Neutrófilo bilobado (Anomalia de Pelger-Huët).	35
Figura 9: Morfologia representativa de linfócitos atípicos.....	35
Figura 10: Morfologia de blastos.	35
Figura 11: (A) Gametócito de Plasmodium falciparum; (B) Trofozoítos de Plasmodium vivax; (C) Trofozoítos de Plasmodium ovale. Fonte SPC-CHUC.	60
Figura 12: Esfregaço de sangue periférico do doente.....	61
Figura 13: Morfologia das células encontradas no esfregaço de sangue periférico: (A) Blasto em forma “cup-like”; (B) e (C) Blasto com bastonetes de Auer.....	62
Figura 14: Crescimento bacteriano em cultura de GS (Hemocultura).	66
Figura 15: Crescimento bacteriano em cultura de GS (LCR).	66
Figura 16: Antibiograma manual para Listeria monocytogenes (Hemocultura).	67
Figura 17: Antibiograma manual para Listeria monocytogenes (LCR).	68
Figura 18: Resultados obtidos pela técnica de citometria de fluxo.....	79
Figura 19: Resultados obtidos pela técnica de FISH.	79

Abreviaturas

AST- Aspartato Aminotransferase

BAAR- Bacilos Ácido-Álcool Resistentes

BCSA- Meio para *Burkholderia cepacia*

BHI- *Brain Heart Infusion*

CAM- Meio de cultura para *Campylobacter* spp.

CBGN- Caldo para Bacilos Gram Negativo

CHCM- Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

CHUC- Centro Hospitalar Universitário de Coimbra

CIN- Cefsulodina-Irgasan-Novobiocina (meio de cultura para *Yersinia* spp.)

CK-MB- Creatina Cinase isoforma MB

CLED- Meio de cultura com Cistina, Lactose e Deficiente em Eletrólitos

CLIA- Ensaio Imunoquimioluminescência

CM- *Cooked Meat*

CMHC- Concentração Média de Hemoglobina Corpuscular

CMI- Concentração Mínima Inibitória

CNA- Gelose *Columbia* com 5% de sangue de carneiro suplementado com Colistina e Ácido Nialidíxico

DNA- *Deoxyribonucleic acid*

EDTA K3- Etilenodiamino treta-acético tripotássico

ELFA- *Enzyme Linked Fluorescence Assay*

ELISA- *Enzyme Linked Immunoabsorbant Assay*

EUCAST- *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FEIA- Imunoensaio fluoroenzimático

GS- Gelose de Sangue

HAE- Meio de cultura para *Haemophilus* spp.

Hb- Hemoglobina

HCM- Hemoglobina Corpuscular Média

Hct- Hematócrito

HGM- Hemoglobina Globular Média

IFI- Imunofluorescência Indireta

INR- *International Normalized Ratio*

INSA- Instituto Nacional Doutor Ricardo Jorge

LCR- Líquido Cefalorraquidiano

LJ- Löwenstein-Jensen

LMA- Leucemia Mielóide Aguda

MALDI-TOF MS- *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry*

MGIT- *Mycobacterium Growth Indicator Tube*

MH- Muller-Hinton

MH-F- Muller-Hinton suplementado com chocolate

NEQAS- *National External Quality Assessment Site*

PANTA- Polimixina B, Anfotericina B, Ácido nalidixico, Trimetoprim e Azlocilina

PCR- *Polymerase Chain Reaction*

PCR- Proteína C Reativa

PVX- Gelose de Chocolate PolyViteX

RDW- Heterogeneidade da população de Eritrócitos

RIQAS- *Randox International Quality Assessment Scheme*

RNA- *Ribonucleic acid*

RPR- *Rapid Plasma Reagin*

RT-PCR- *Real Time Polymerase Chain Reaction*

SGC2- Sabouraud com Gentamicina e Cloranfenicol

SPC-CHUC- Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra

SS- Meio de cultura para *Salmonella* spp. e *Shigella* spp.

TP- Tempo de Protrombina

TP-PA- *Treponema Passive Particle Agglutination*

TSA- Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

TTPa- Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada

UKNEQAS- *United Kingdom External Quality Assessment Service*

VCAT- Meio de cultura para *Neisseria* spp.

VCM- Volume Corpuscular Médio

VPM- Volume Plaquetário Médio

VS- Velocidade de Sedimentação

Resumo

No âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, realizei o estágio curricular no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra (SPC-CHUC) ao longo de 6 meses. Este estágio permitiu-me trabalhar nas diferentes áreas de um laboratório de análises clínicas e ficar a conhecer todo o processo analítico desde a colheita das amostras, passando pela sua análise e controlo analítico até à validação dos resultados. Para além disso, possibilitou-me a consolidação de conhecimentos adquiridos no decorrer do mestrado e o, mais importante, adquirir experiência prática na realização dos diferentes procedimentos laboratoriais.

Neste sentido, no presente relatório são apresentadas as diferentes atividades realizadas nos setores de Imunologia, Bioquímica, Hematologia e Microbiologia, dando mais ênfase às áreas de Hematologia e Microbiologia.

Palavras-chave: Análises Clínicas, SPC-CHUC, Microbiologia, Hematologia.

Abstract

As part of the master's degree in Clinical Analyses in the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra, I did my curricular internship in the Clinical Pathology Service of the Coimbra University Hospital Centre (SPC-CHUC) for 6 months. This internship allowed me to work in the different areas of a clinical analysis laboratory and to get to know the whole analytical process from the collection of samples to their analysis and analytical control until the validation of the results. In addition, it allowed me to consolidate the knowledge acquired during the master's degree and, most importantly, to acquire practical experience in carrying out the different laboratory procedures.

In this sense, this report presents the different activities performed in the sectors of Immunology, Biochemistry, Hematology and Microbiology, giving more emphasis to the areas of Hematology and Microbiology.

Keywords: Clinical analyses, SPC-CHUC, Microbiology, Hematology.

I. Caracterização do laboratório

O presente estágio curricular decorreu no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra (SPC-CHUC) que é o resultado da fusão de cinco principais hospitais da região de Coimbra: Hospital Universitário de Coimbra, Hospital Pediátrico e Hospital dos Covões, Maternidade Bissaya Barreto e Maternidade Daniel de Matos.

O Serviço de Patologia Clínica do centro Hospitalar Universitário de Coimbra encontra-se setorizado por diferentes laboratórios: Imunologia, Bioquímica, Hematologia e Microbiologia.

O laboratório é constituído por uma sala de colheitas que possui um sistema prioritário de utentes, no qual os doentes considerados urgentes como transplantados, doentes oncológicos e diabéticos têm prioridade no atendimento. Além das amostras recolhidas da sala de colheitas, o hospital possui um sistema de tubos pneumáticos que permite que as amostras provenientes das diferentes enfermarias do hospital cheguem ao laboratório mais rapidamente. No entanto, o laboratório também recebe amostras provenientes de outras unidades de saúde distribuídas pela região centro do país. Da mesma forma, o CHUC, quando não se justifica o processamento de determinado parâmetro analítico, envia as amostras para laboratórios exteriores como, por exemplo, o Instituto Nacional de saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) e o Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT).

Todas as amostras que chegam ao SPC-CHUC é atribuído um código de barras e um código alfa numérico, procedido por uma letra, que permite identificar a proveniência da amostra, bem como, se se trata de uma amostra urgente. Posteriormente são encaminhadas para a zona do *core lab* onde são integradas no sistema informático *Clinidata XXI* e inseridas na cadeia automática, que através do código de barras atribuído vai permitir direccionar as diferentes amostras para os devidos equipamentos do *core* ou distribuí-las para os respetivos setores para que sejam processadas.

A implementação do sistema informático *Clinidata XXI* veio permitir uma melhor gestão e organização laboratorial. Este *software* possibilita a integração das amostras, permite o acesso ao histórico de análises do doente, permite rastrear as amostras, validação de análises e se necessário acrescentar ou repetir análises.

2. Fases do processo analítico

A primeira fase do processo analítico é a fase **pré-analítica** que compreende a colheita das amostras biológicas. Assim que o doente chega à sala de colheitas é extremamente importante verificar a identificação do doente para evitar possíveis erros. Posteriormente averiguar se o doente cumpre os requisitos pedidos, como jejum ou se cumpriu determinada dieta específica, para se proceder à colheita das amostras biológicas. Caso alguma amostra tenha sido colhida pelo próprio doente averiguar se a colheita foi feita corretamente. Se tudo se encontrar em conformidade procede-se à identificação dos tubos que contém o nome do doente seguido de um código de barras e código alfa numérico que permite identificar a proveniência do tubo bem como a que setor se destina. No momento da colheita, ter em consideração diferentes situações que podem interferir com a qualidade da amostra como o tempo de garrote bem como a ordem dos tubos pela qual deve ser realizada a colheita para que não haja contaminação. Assim, deve-se iniciar pela colheita para análise microbiológica, posteriormente para o tubo com citrato de sódio, que contém fatores que ativam a coagulação, tubo com heparina e por último o tubo com ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássico (EDTA K3).

A segunda fase do processo é a **fase analítica** que se inicia pela triagem das amostras por parte dos assistentes administrativos que consiste na receção e integração das amostras no *core lab*. De realçar que nesta fase é importante estar alerta para possíveis não conformidades que muitas vezes podem ditar a rejeição das amostras: como é o caso de amostras em recipientes inadequados, tubos sem identificação e com um volume insuficiente de amostra, condições de transporte incorretas, entre outras.

Após este processo de verificação, as amostras são inseridas na cadeia de automação que faz a sua distribuição pelos diferentes equipamentos e setores.

Por último, a fase **pós-analítica** que corresponde á interpretação e validação dos resultados por parte do clínico especialista.

3. Controlo de qualidade

A avaliação da qualidade é o que permite assegurar a um laboratório a excelência do seu desempenho durante todo o processo analítico de modo a garantir a fiabilidade dos seus resultados. O controlo de qualidade corresponde ao conjunto de normas que um laboratório segue de modo a evitar a ocorrência de possíveis erros que interfiram na reprodutibilidade dos resultados bem como a monitorização continua de todos os processos analíticos realizados. Neste sentido, o SPC-CHUC realiza vários controlos de qualidade internos e também participa em programas externos de avaliação de controlo de qualidade.

3.1. Controlo de qualidade interno

O controlo de qualidade interno tem como objetivo avaliar os parâmetros analíticos numa amostra controlo, geralmente amostras comerciais em que se conhece a concentração do analito. Existem três níveis de controlo: nível 1, controlo baixo; nível 2, controlo médio; nível 3, controlo alto. Consoante o tipo de equipamento os controlos podem ser realizados todos os dias ou semanalmente.

De acordo com as informações fornecidas pela casa comercial, os equipamentos traçam automaticamente as cartas de controlo de acordo com as regras de *Westgard*¹. Este processo é diariamente monitorizado pelo pessoal técnico do laboratório de modo a assegurar a fiabilidade e o rigor dos resultados.

3.2. Controlo de qualidade externo

O controlo de qualidade externo permite comparar o desempenho de vários laboratórios de referência. Ao laboratório chegam amostras desconhecidas, que vão ser analisadas de acordo com a rotina laboratorial. O resultado de determinado parâmetro obtido por cada entidade é comparado com a média dos resultados obtidos, a partir dos laboratórios participantes, em que é utilizada a mesma metodologia. Posteriormente, os participantes recebem os relatórios que avaliam o desempenho e que permitem, se necessário, a implementação de ações corretivas. No SPC-CHUC todos os laboratórios são sujeitos a programas de avaliação externa da qualidade, tais como, *United Kingdom External Quality Assessment Service (UKNEQAS)*, *Randox International Quality Assessment Scheme (RIQAS)*, Instituto Nacional Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre outros.

4. Imunologia

O setor da imunologia do SPC-CHUC encontra-se dividido em dois laboratórios: imunologia e alergologia e autoimunidade.

No setor de imunologia uma das análises mais requisitadas pelos clínicos é a eletroforese das frações das proteínas séricas: albumina, α 1-globulina, α 2-globulina, β 1-globulina, β 2-globulina e γ -globulina. A eletroforese permite separar as diferentes frações de proteínas permitindo identificar a presença de bandas anormais. Assim, é necessária uma interpretação atenta e pormenorizada do perfil eletroforético das proteínas. No caso de haver um aumento acentuado em alguma das frações proteicas principalmente na fração gama, que é fração com maior interesse clínico, é realizada uma imunofixação. Esta metodologia permite caracterizar com maior sensibilidade o tipo de imunoglobulina envolvida (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE e cadeias kappa e lambda) com o objetivo de determinar o tipo de patologia ou gamopatia. As gamopatias podem ser policlonais com as diferentes classes de imunoglobulinas aumentadas, que podem ser devido a quadros clínicos inflamatórios, ou monoclonais que se encontram fortemente associados a um processo clonal maligno. Na Tabela I encontram-se descritas alguns exemplos de parâmetros analíticos doseados neste setor:

Tabela I: Parâmetros analíticos e respetivos métodos utilizados no laboratório de imunologia.

Equipamento	Método	Parâmetros
Capillarys 2 Flex Piercing, Sebia	Eletroforese capilar	Proteinograma de proteínas séricas
Hidrasys 2 (Phadia)	Imunofixação	Pesquisa e caracterização de bandas monoclonais; caracterização proteinúria
BN ProSpec (Siemens)	Nefelometria	Cadeias leves e β 2-globulina na urina, Fator reumatóide, Subclasses IgG
Optilite	Turbidimetria	Cadeias leves livres, CH50
Immuno Cap 250 (Phadia)	FEIA (Imunoensaio fluoroenzimático)	IgE específica, IgG específica alérgenos, Triptase
Técnica Manual	Imunodifusão radial	C2; C5

O setor de autoimunidade encontra-se focado no estudo e monitorização de doenças autoimunes. As doenças autoimunes caracterizam-se pela presença de autoanticorpos, ou seja, anticorpos direcionados contra antígenos do próprio organismo. Neste setor o principal objetivo é a identificação desses autoanticorpos para que se consiga identificar o tipo de

doença autoimune. Na Tabela 2 estão assinalados alguns exemplos das principais metodologias e os parâmetros analíticos realizados no laboratório de autoimunidade.

Tabela 2: Principais parâmetros analíticos e respetivas metodologias utilizadas no laboratório da autoimunidade.

Equipamento	Método	Parametro
IF Sprinter (Euroimmun)	Imunofluorescência Indireta	Anti-corpos Anti-dsDNA, Anticorpos antinucleares e citoplasmáticos
Bio-Flash (Werfen)	Quimioluminescência	Anticorpos anti-antígenos nucleares extraíveis (ENA); Anticorpo Anti-DFS70; Anticorpos anti-membrana basal glomerular.
Analyser (Euroimmun)	ELISA	Anticorpo Anti-cardiolipina; Anticorpo anti-fator intrínseco.
ImmunoCap 250 (Phadia)	FEIA	Anticorpos anti-Gliadina (IgA e IgG); anti Transglutaminase tecidual (IgA e IgG); Anticorpos anti-dsDNA; anticorpos anti-mieloperoxidase; Anticorpos anti-proteinase 3
EUROBlot One (Euriummun)	Immunoblotting	Anticorpos contra antígenos neuronais; anticorpos direcionados para miosites; ; Anticorpos contra antígenos hepáticos.
Wallac Wizard 1470 Automatic Gamma Counter	Radioimunoensaio	Anticorpos anti-dsDNA; Anticorpo anti-insulina

5. Bioquímica

O setor de Bioquímica situa-se maioritariamente no laboratório de urgência do *corelab*. Neste setor é possível o doseamento de diversos parâmetros clínicos com a finalidade de avaliar as mais diversas funções do organismo, como função renal, função hepática, função cardíaca, bem como o equilíbrio hidro-eletrolítico.

Neste setor a amostra principal é o soro que é colhida para um tubo de gel com posterior centrifugação a 3000rpm durante 15 minutos. Para além do soro, chegam a este setor amostras de urina que devem ser devidamente colhidas para contentores estéreis para posteriormente se proceder à análise físico-química e a observação do sedimento urinário. Além disso, existem também algumas análises que são feitas nos laboratórios adjacentes, tais como a análise química de cálculos renais, presença de gordura nas fezes e o doseamento de alguns fármacos.

Como já foi dito anteriormente, a grande maioria dos parâmetros analíticos deste setor são doseados no *corelab* em equipamentos automatizados (*Alinity C, Alinity I, Liason*) em que os principais métodos utilizados são a turbidimetria, espectrofotometria, potenciometria e

quimioluminescência. Na Tabela 3 estão descritos os principais parâmetros e metodologias utilizadas neste setor.

Durante a realização deste estágio também passei pelo laboratório de urgência do HP onde observei algumas diferenças, comparativamente ao SPC-CHUC. Uma das principais diferenças é o fluxo de amostras que é menor, bem como, o número de equipamentos utilizados neste setor. Além disso, dado que a grande maioria dos utentes deste hospital são crianças, o volume das amostras tem de ser colhido tendo em atenção o peso da criança para a obtenção de resultados fidedignos.

Tabela 3: Principais parâmetros analíticos e respetivos métodos utilizados no setor de bioquímica.

Parâmetro	Metodologia
Espectrofotometria	Albumina, Aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, Fosfatase alcalina, Bilirrubina, Glicose, Azoto ureico, Creatinina, Ácido úrico, Amónia, Microalbuminúria, Amilase, Colesterol, Triglicéridos, LDL, HDL,
Turbidimetria	ApoA1, ApoB, Microalbuminúria Tranferrina,
Imunoensaio Quimioluminescência	Aldosterona, Renina, Mioglobina, Procalcitonina, Vitamina B12, Vitamina D, Peptídeo natrurético tipo B, Troponina de alta sensibilidade, Sirolimus, Tacrolimus, Ciclosporina
Potenciometria	Sódio, cloreto, potássio
Fotometria	Sumária de urina
Cromatografia líquida de alta eficiência	Hemoglobina glicada
Espectrofotometria absorção atómica	Alumínio, cobre lítio, zinco

6. Hematologia

6.1. Hemograma

O hemograma é um exame complementar de diagnóstico sendo uma das análises mais frequentemente pedidas pelos clínicos a nível laboratorial. Este exame vai permitir avaliar qualitativamente e quantitativamente os três principais componentes celulares do sangue periférico: os eritrócitos (glóbulos vermelhos), os leucócitos (glóbulos brancos) e as plaquetas sanguíneas.

A amostra utilizada no hemograma é o sangue total que é colhido para um tubo contendo anticoagulante EDTA-K3. A utilização deste anticoagulante tem como objetivo inibir a coagulação sanguínea através da formação de complexos irreversíveis com o cálcio (ião essencial ao processo de coagulação), inibindo desta forma a formação de um coágulo sanguíneo.

6.1.1. Eritrograma

O eritrograma corresponde à componente do hemograma que consiste na avaliação em termos quantitativos dos glóbulos vermelhos assim como do seu tamanho, forma e conteúdo em hemoglobina.

Os eritrócitos ou glóbulos vermelhos são por definição células que não possuem núcleo, em forma de disco bicôncavo, que são produzidos na medula óssea pelo processo da eritropoiese. Na sua constituição possuem uma proteína essencial à sua função, a hemoglobina, que é constituída por 4 grupos heme ligados a quatro cadeias de globina, e que tem a capacidade de ligar e transportar quatro moléculas de oxigénio.

De modo a avaliar a estrutura e função dos eritrócitos recorre-se a determinados parâmetros avaliados pelo eritrograma, sendo estes:

- **Contagem total eitrócitos (RBC – Red Blood Cell):** Corresponde ao número total de eritrócitos por microlitro de sangue.
- **Hemoglobina (Hb):** Concentração total de hemoglobina presente na amstra de sangue, expressa em g/dL.
- **Hematócrito (HCT):** representa a porção de eritrócitos presente no volume total de sangue após centrifugação, expresso em percentagem (%).

Índices Hematimétricos

Os índices hematimétricos são utilizados para definir o tamanho, volume e conteúdo em hemoglobina dos eritrócitos e é com base nestes parâmetros que se classifica as anemias.

- **Volume corpuscular médio (VCM):** representa o volume médio dos eritrócitos, expresso em fentolitros (fL). Calcula-se pela seguinte fórmula²:

$$VCM = \frac{Ht \text{ (L/L)}}{\text{Numero de eritrócitos } (\times 10^{12}/L)} = fL$$

- **Hemoglobina corpuscular média (HCM):** corresponde à quantidade de hemoglobina presente em cada eritrócito, expresso em picogramas (pg). Calcula-se pela seguinte fórmula²:

$$HCM = \frac{Hb \text{ (}\times 10g/dL\text{)}}{\text{Numero de eritrócitos } (\times 10^{12}/L)} = pg$$

- **Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM):** Concentração hemoglobina presente em cada eritrócito, o valor é apresentado em g/dL. Calcula-se pela seguinte fórmula²:

$$CHCM = \frac{Hb \text{ (g/dL)}}{Ht \text{ (L/L)}} = g/dL$$

- **Heterogeneidade da população de eritrócitos (RDW):** avalia o índice de anisocitose, ou seja, a variação do tamanho dos eritrócitos, expresso em percentagem (%).

Além da contagem de eritrócitos, a contagem de reticulócitos e eritroblastos também poderão ser parâmetros avaliados no hemograma. Os reticulócitos correspondem a células imaturas precursoras dos eritrócitos que possuem RNA (*Ribonucleic acid*) na sua constituição e organelos como mitocôndrias e ribossomas². A contagem de reticulócitos é um indicador da atividade eritropoética da medula óssea. Níveis elevados de reticulócitos no sangue periférico podem indicar que a medula óssea está a tentar compensar a perda de eritrócitos que pode ocorrer devido a hemorragia ou pela destruição destas células (anemias hemolíticas). Por outro lado, uma baixa quantidade de reticulócitos pode estar associado a uma hipofunção da medula³.

6.1.2. Série eritrocitária: Alterações quantitativas

Índices hematimétricos fora dos intervalos de referência e alterações na morfologia dos eritrócitos, como hipocromia e policromatofilia devem ser avaliados principalmente no caso de gestantes, crianças e idosos que necessitam de maior atenção devido à incidência de anemia nestas populações.

A anemia define-se pelo valor de Hb abaixo do valor de referência (<13,5 g/dL nos homens e <12 g/dL nas mulheres), que pode ser acompanhado ou não pela diminuição do número de eritrócitos. Para a classificação do tipo de anemia utiliza-se o VCM que nos indica se é uma anemia microcítica, normocítica ou macrocítica, assim como o valor de HCM que nos permite classificar a anemia em anemia hipocrômica, normocrômica ou hiperocrômica. Por outro lado, a contagem de reticulócitos permite distinguir as anemias regenerativas (valores altos de reticulócitos) das anemias hiporregenerativas (valores diminuídos de reticulócitos).

Uma das principais causas de anemia **hipocrômica microcítica** (VCM <80 fL) principalmente nas crianças e em mulheres adultas, é a deficiência de ferro causada por desequilíbrios na ingestão de ferro, má absorção do ferro, sangramentos, ou devido a talassémias. Além disso, verifica-se que em alguns casos existe uma deficiência funcional de ferro, ou seja, existe falta de ferro disponível para o processo eritropoiético apesar dos níveis séricos de ferritina serem normais e também haver presença de depósitos de ferro na medula óssea. Este tipo de situações acontece em alguns casos de anemia da doença crônica e em indivíduos que têm insuficiência renal crônica sujeitos a tratamento com medicamentos que estimulam a eritropoiese⁴.

Quando os valores de VCM e HCM se encontram dentro dos valores de referência (VCM entre 80 e 100fL e HCM entre 27 e 32pg) a anemia classifica-se como anemia normocítica normocrômica. A grande maioria das anemias **normocíticas normocrômicas** são a consequência de outras doenças como por exemplo, insuficiência renal, disfunção endócrina (hipotireoidismo, hipopituitarismo) e em casos de anemia da doença crônica que resulta de infecções ou de estados inflamatórios crônicos e neoplasias⁴. A fisiopatologia deste tipo de anemias é complexa, e pode envolver um aumento das citocinas próinflamatórias que provocam um aumento nos níveis de hepcidina. A hepcidina liga-se à ferroportina (proteína exportadora de ferro celular) que se encontra presente nos macrófagos, hepatócitos e enterócitos⁵.

Níveis aumentados de hepcidina inibem a liberação de ferro aumentando os depósitos de ferro nos macrófagos e hepatócitos pela degradação da ferroportina, conseqüentemente ocorre uma redução dos níveis séricos de ferro⁵. Além disso, a liberação de citocinas,

nomeadamente a IL-6, está relacionada com a diminuição da resposta dos eritrócitos à ação da eritropoietina^{4,5}.

Por último, as **anemias macrocíticas** que se caracterizam por um VCM > 100 fL que podem surgir em casos de anemias megaloblásticas que se caracterizam por haver uma assincronia entre a maturação do núcleo (está atrasado) em relação ao citoplasma. Normalmente este tipo de anemias deve-se a deficiência em nutrientes essenciais como ácido fólico e vitamina B12 ou à alteração da absorção da vitamina B12, pela produção insuficiente do fator intrínseco (anemia perniciosa). A vitamina B12 e o ácido fólico são essenciais para a síntese de ácidos nucleicos, assim em situações em que existe défice destes fatores o processo de eritropoiese fica comprometido resultando numa assincronia entre o núcleo/ citoplasma dando origem a precursores eritroides com anomalias no núcleo (ex: núcleo hipersegmentado) e com volume superior ao normal. As anemias megaloblásticas são um exemplo de anemia macrocítica que se definem pela presença de macrocitose e neutrófilos hipersegmentados⁷.

6.2. Leucograma

O leucograma consiste na avaliação e interpretação de parâmetros como a contagem das células de linhagem branca assim como da sua morfologia. A diferenciação dos leucócitos é realizada através da técnica de citometria de fluxo que permite agrupar as diferentes populações de leucócitos de acordo com o seu tamanho e complexidade. Além da contagem dos leucócitos, a análise do esfregaço de sangue periférico também fornece informações uteis que permitem avaliar a maturação das células de linhagem branca (averiguar a presença de blastos e células displásicas) e a existência de granulações tóxicas, permitindo desta forma o diagnóstico de doenças hematológicas.

Desta forma, valores de parâmetros do leucograma fora dos intervalos de valores de referência podem estar relacionados com diferentes etiologias, como estados inflamatórios, imunossupressão devido a fármacos, mas também podem estar associados a causas benignas como gravidez, stress e exercício físico. Na Tabela 4 encontram-se referenciadas algumas etiologias associadas ao aumento do número de leucócitos.

Tabela 4 : Principais etiologias clínicas relacionadas com leucocitose. Adaptado de^{7:8}.

Leucócitos	Etiologias clínicas associadas com o aumento de leucócitos
Neutrófilos	Inflamação crónica, infeções congénitas, infeções, indução por fármacos, doenças mieloproliferativas, esplenectomia.
Linfócitos	Leucemias agudas ou crónicas, infeções (virais ou bacterianas), reações de hipersensibilidade.
Monócitos	Infeções (virais ou fúngicas), doenças autoimunes (lupus, artrite reumatóide, doença inflamatória intestinal).
Eosinófilos	Alergias, infeções parasitárias, indução por fármacos, Síndrome Hipereosinofílica idiopática, neoplasias.
Basófilos	Alergias, leucemias, doenças inflamatórias crónicas.

6.3. Metodologias associadas ao Hemograma

No laboratório de Hematologia está instalada a cadeia de analisadores hematológicos XN-9000 da Sysmex que inclui três contadores XN-10, um contador XN-20, um módulo SP-10 e um módulo de análise digital da morfologia celular DI-60.

Estes analisadores hematológicos têm como base várias metodologias: Citometria de Fluxo com Fluorescência, Impedância com focagem Hidrodinâmica e o Método de Sulfato Lauril de Sódio, livre de cianeto para medição da concentração de hemoglobina.

6.3.1. Citometria de fluxo

A Citometria de Fluxo por Fluorescência permite avaliar características fisiológicas e químicas das células e de outras partículas biológicas. Esta metodologia permite obter informação sobre o tamanho, estrutura e o interior da célula.

Primeiramente a amostra é diluída de acordo com o fator pré-determinado e posteriormente é incubada com uma sonda fluorescente que se vai ligar aos ácidos nucleicos (DNA ou RNA). Seguidamente a amostra é passa pela célula de fluxo onde incide um feixe de luz monocromática proveniente de um laser semiconductor, emitido num determinado comprimento de onda. Este laser semiconductor consegue identificar as células utilizando três sinais: i) dispersão frontal de luz (*forward scatter* ou FSC) que é diretamente proporcional ao tamanho das células, permitindo avaliar o seu tamanho; ii) a dispersão lateral de luz (*side scatter* ou SSC), que permite avaliar a estrutura das células, a sua complexidade e granularidade, e iii) a fluorescência lateral (*side fluorescence* ou SFL) fornece informação acerca da concentração de DNA (*Deoxyribonucleic acid*) e RNA presente na célula¹⁰.

Utiliza-se a citometria de fluxo com fluorescência para as contagens de células sanguíneas, por exemplo, no caso da contagem total e diferencial de leucócitos e contagem de eritroblastos e reticulócitos¹⁰. O hematocitometro é constituído por diferentes canais específicos que permitem a contagem das diferentes populações celulares numa amostra de sangue. No canal WNR (*White Cell nucleated*) permite a contagem total de leucócitos e posterior determinação e contagem dos basófilos e eritroblastos. O canal WDF (*White Cell differential channel*) permite a determinação das diferentes populações leucocitárias: granulócitos imaturos, neutrófilos, monócitos, linfócitos e eosinófilos. Estes dois canais utilizam a metodologia de citometria de fluxo com fluorescência. Além disso, acoplado ao canal WDF existe o canal WPC (*White cell precursor*) que emite um alerta quando deteta a presença de células imaturas leucocitárias (células precursoras) como blastos ou linfócitos anormais. Desta forma, permite a deteção de células leucocitárias que podem estar subjacentes a etiologias malignas¹¹.

O canal PLT-F (*Fluorescent platelet channel*) é utilizado como segunda metodologia para a identificação de plaquetas quando surge um alerta positivo de contagem de plaquetas por impedância elétrica. Neste canal é utilizada a tecnologia de citometria de fluxo, em que se utiliza um fluorocromo específico para plaquetas, que se vai ligar aos ácidos nucleicos destas células permitindo a sua identificação¹⁰.

Por último, o canal RET que permite separar os reticulócitos dos eritrócitos maduros. Neste canal o marcador fluorescente ao penetrar na célula vai ligar-se aos ácidos nucleicos resultando na emissão de fluorescência. Quanto maior o conteúdo em ácidos nucleicos maior será a intensidade do sinal.

6.3.2. Impedância com focagem Hidrodinâmica

A contagem dos eritrócitos e plaquetas baseia-se no método de impedância elétrica de Coulter. Esta técnica consiste em diluir a amostra numa solução isotónica salina que possui condutividade elétrica e, além disso, permite que a forma e o tamanho das células não se alterem.

A suspensão de células é forçada a passar uma a uma, numa pequena abertura entre dois eléctrodos que geram um campo eléctrico. Quando ocorre a passagem das células ocorre alterações na corrente existente entre os eléctrodos. Essas alterações na voltagem são detetadas e registadas sob a forma de impulso eléctrico.

O número de pulsos gerados corresponde ao número de células que passam pela abertura e a amplitude do pulso é proporcional ao volume da célula permitindo traçar num histograma de distribuição de volume¹².

6.3.3. Velocidade de Sedimentação

A velocidade de sedimentação (vs) no SHUC é feita com o recurso ao equipamento Vesmatic Cube 30. Este equipamento automatizado permite avaliar o processo de sedimentação eritrocitária através de um sensor (sensor optoeétrico) que mede o nível de opacidade da coluna de eritrócitos. No equipamento as amostras são colocadas verticalmente e sujeitas a movimentos de rotação sendo feita a leitura ótica de cada uma das amostras. Os resultados são obtidos ao fim de 33 minutos e são comparados com os valores obtidos pela técnica de referência de Westergren ao fim de 1 hora^{6;7}.

A determinação da VS permite a monitorização de algumas patologias inflamatórias como, a artrite reumatoide, a polimialgia reumática e o lúpus eritematoso sistémico. No entanto, a VS por si só, não é um indicador específico de doença podendo estar alterada em determinadas condições, tais como, gravidez, anemia e até mesmo com avançar da idade. Assim, para assegurar um diagnóstico mais fidedigno na suspeita de um quadro inflamatório são recomendados testes complementares mais fiáveis, como por exemplo o doseamento da proteína C reativa^{13;14}.

6.3.4. Esfregaço de sangue periférico

A visualização microscópica do esfregaço de sangue periférico permite avaliar a morfologia dos leucócitos, eritrócitos, plaquetas e fazer uma contagem diferencial de leucócitos.

Em contexto hospitalar, nomeadamente no SPC-CHUC, dado a quantidade de amostras que chegam ao laboratório, seria impossível a realização de esfregaços de sangue periférico de todas as amostras. Desta forma, existem critérios para a sua realização que consistem na deteção, por parte do equipamento automático, aquando da realização do hemograma e leucograma, de células malignas, como bastos e células displásicas.

O esfregaço de sangue periférico pode ser feito manualmente colocando uma gota de sangue na extremidade de uma lâmina e com auxílio de uma lamela espalha-se a gota de sangue de modo a ficar com uma camada fina. Posteriormente, com a lâmina já seca é feita a coloração com o corante do tipo Romanowsky¹⁵.

No SPC-CHUC este processo é feito de maneira automatizada no aparelho SP-10, em que é realizado o esfregaço de sangue periférico e respetiva coloração pela técnica May-Grünwald-Giemsa. Posteriormente a lâmina é digitalizada, com recurso ao módulo de análise digital da morfologia celular DI-60, que envia diretamente essa digitalização para o *software* *Cella Vision*. Este *software* permite identificação das células de linhagem branca assim como dos

glóbulos vermelhos de acordo com as suas características morfológicas. Esta pré-identificação é uma grande ajuda para o diagnóstico, no entanto encontra-se sujeita a erros como a incorreta classificação das células. Desta forma, é imprescindível a correta observação do esfregaço de sangue pelo patologista clínico que consegue facilmente alterar a classificação atribuída pelo *software* assegurando o correto diagnóstico clínico.

6.4. Serie eritrocitária: alterações morfológicas

A avaliação das células da série eritrocitária num esfregaço de sangue periférico é feita tendo em conta a anisocromia que se caracteriza pela variação de cor dos eritrócitos (hipocrómicos ou normocrómicos); a anisocitose que é caracterizada pela variação no tamanho dos eritrócitos (microcíticos, normocíticos ou macrocíticos) e por último a poiquilocitose que consiste em alterações na forma dos eritrócitos. De seguida, na Tabela 5 serão descritas algumas das alterações na morfologia eritrocitária que se podem observar microscopicamente num esfregaço de sangue periférico.

Tabela 5: Diferentes tipos de alterações morfológicas eritrocitárias encontradas num esfregaço de sangue periférico: Eliptócitos; Drepanócitos e Esferócitos. Adaptado de ⁴.

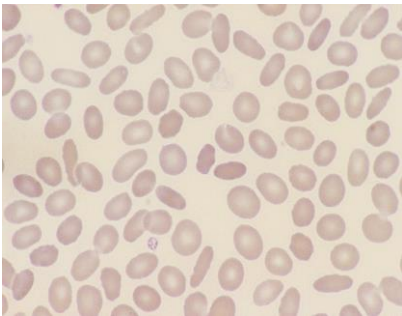
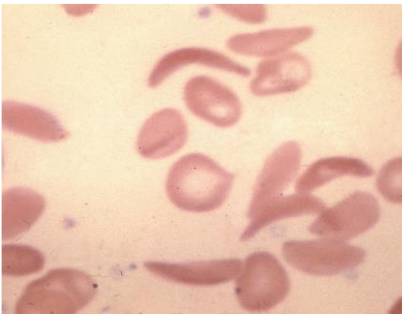
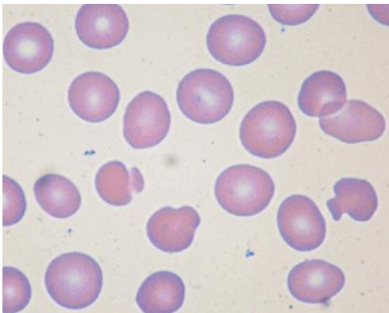
<p style="text-align: center;">Eliptócitos</p> 	<p>Os eritrócitos apresentam uma forma alongada e oval, devido a alterações na membrana citoplasmática causadas por alterações genéticas nas proteínas do citoesqueleto. Podem surgir em situações clínicas como eliptose hereditária, doença renal ou hepática, mielofibrose, talassémia e anemia ferropénica⁴.</p>
<p style="text-align: center;">Drepanócitos</p> 	<p>Também denominados de células em forma de foice que surgem devido à anormal produção de hemoglobina, sendo a mais comum a forma HbS que ao polimerizar deforma os eritrócitos o que lhes confere a forma característica pela qual são denominados. Este tipo de morfologia encontra-se associado a hemoglobinopatias nomeadamente a anemia falciforme ou drepanocitose².</p>
<p style="text-align: center;">Esferócitos</p> 	<p>O eritrócito tem um aumento da espessura no centro que resulta na perda de biconcavidade com uma redução da membrana plasmática em relação ao volume citoplasmático. Os eritrócitos têm a forma redonda, são densos, com palidez central. A forma de esferócito pode resultar de um defeito nas proteínas da membrana que leva a que a estrutura membranar seja anormal e consequentemente o eritrócito perde a biconcavidade tornando-se esférico. Surgem em situações clínicas como a esferocitose hereditária, anemia hemolítica autoimune, hiperesplanismo, queimaduras^{12;15}.</p>

Tabela 6.1: Diferentes tipos de alterações morfológicas eritrocitárias encontradas num esfregaço de sangue periférico: Células em alvo; Equinócitos; Esquizócitos e Dacriocitos. Adaptado de ⁴.

<p style="text-align: center;">Células em alvo</p> 	<p>Também podem ser denominadas Target Cells ou codócitos. Apresentam uma anomalia na distribuição da hemoglobina que faz com que o eritrócito fique mais hemoglobinizado no centro e na periferia mais hipocrômico. Podem surgir em situações clínicas como talassemias, doença da hemoglobina C, doença hepática, anemia ferropênica².</p>
<p style="text-align: center;">Equinócitos</p> 	<p>Eritrócitos com membrana celular anormal com prolongamentos membranares (espículas). Podem surgir em situações clínicas como, anemias hemolíticas, síndrome hemolítico-urémico, insuficiência renal, e queimaduras⁴.</p>
<p style="text-align: center;">Esquizócitos</p> 	<p>Correspondem a fragmento de eritrócitos que apresentam espículas de tamanho variável distribuídas aleatoriamente pela superfície dos eritrócitos. As células são produzidas como resultado da destruição dos eritrócitos. Este tipo de morfologia pode surgir em casos de anemia hemolítica em situações de rejeição de transplante renal.²</p>
<p style="text-align: center;">Dacriócitos</p> 	<p>Eritrócitos em forma de lágrima que podem surgir em condições clínicas como a hematopoiese extramedular, mielofibrose, anemia mieloftísica, anemia megaloblásticas, talassémias, hiperesplenismo⁴.</p>

Para além das alterações na forma dos eritrócitos, também é possível a observação de diferentes tipos de inclusões eritrocitárias que podem surgir associadas a diversas condições clínicas. Estas inclusões podem corresponder a fragmentos ou agregados de ácidos nucleicos (ADN e RNA), agregados de mitocôndrias, ribossomas, e partículas de ferro.

Nas Figuras 1, 2 e 3 encontram-se representadas alguns exemplos de inclusões eritrocitárias e respetiva descrição.

Ponteado basófilo

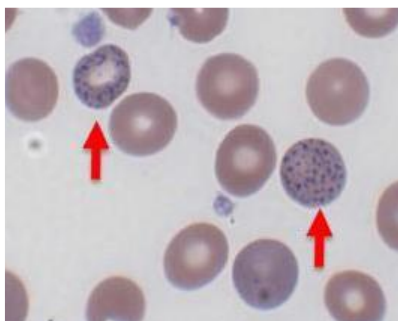


Figura 1: Eritrócitos com ponteado basófilo. Adaptado de¹⁷.

Eritrócitos que contêm grânulos constituídos por agregados ribossomais formados por RNA que contêm uma coloração escura azulada, que preenchem todo o eritrócito (Figura 1). Aparecem em condições clínicas que podem estar associados a distúrbios no processo de síntese do grupo heme, envenenamento por chumbo e anemias severas².

Corpúsculos de Howell-Jolly



Figura 2: Eritrócito contendo corpúsculo de Howell-Jolly. Adaptado de¹⁷.

Inclusões eritrocitárias que correspondem a fragmentos nucleares maioritariamente compostos por DNA de coloração púrpura que podem aparecer em períodos em que ocorre uma aceleração no processo de eritropoiese (Figura 2). Encontram-se associados a anemias hemolíticas, anemia perniciosa e hipoesplenismo².

Corpúsculos de Pappenheimer

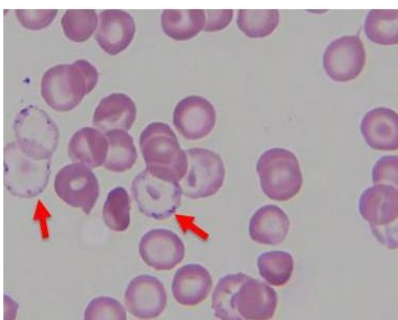


Figura 3: Eritrócito contendo corpúsculo de Pappenheimer. Adaptado de¹⁷.

Eritrócitos que contêm grânulos constituídos por agregados de mitocôndrias e ribossomas juntamente com partículas de ferro que apresentam uma coloração púrpura (Figura 3). Aparecem na periferia dos eritrócitos e clinicamente estão relacionados a anemias sideroblásticas, hipoesplenismo e anemias hemolíticas².

Por outro lado, também podem ser observadas no esfregaço de sangue periférico alterações na distribuição dos eritrócitos como é o caso da aglutinação eritrocitária e da presença de rouleaux eritrocitário (Figura 4). Estes dois tipos de distribuição eritrocitária muitas das vezes são de difícil distinção o que requer uma análise atenta.

A aglutinação eritrocitária é causada pela presença de anticorpos, normalmente IgM, contra antígenos dos eritrócitos, o que provoca agregados eritrocitários¹⁷. A presença de rouleaux eritrocitário no esfregaço de sangue periférico corresponde a eritrócitos dispostos em agregados que se assemelham a pilhas de moedas. Este tipo de distribuição dos eritrócitos resulta da neutralização de carga negativa da superfície dos eritrócitos quando ocorre um excesso de proteínas plasmáticas com carga positiva, tais como β -globulinas e fibrinogênio¹³.

Clinicamente encontra-se associado a patologias como mieloma múltiplo e macroglobulinemia¹⁷.

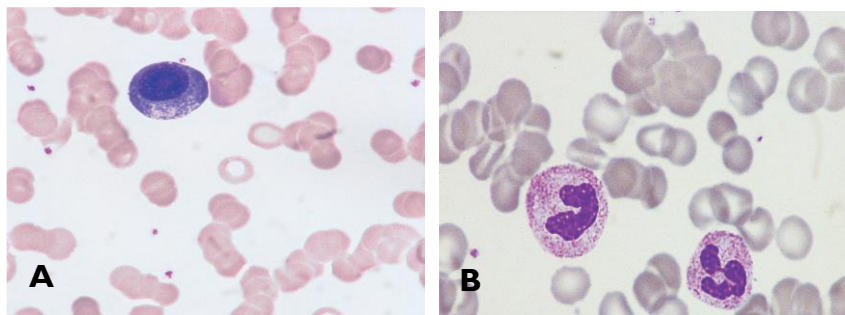


Figura 4: (A) Rouleaux eritrocitário; (B) Aglutinação eritrocitária. Adaptado de⁴.

6.5. Serie leucocitária: morfologia

Na observação do esfregaço de sangue periférico também é possível avaliar morfologicamente as diferentes populações de leucócitos que englobam: neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos. Neste sentido, será apresentada mais detalhadamente a morfologia dos diferentes grupos de leucócitos.

Os neutrófilos (Figura 5: A) são a população de leucócitos mais abundante no sangue periférico. Morfologicamente estas células apresentam um núcleo segmentado que pode conter entre 2 a 5 lóbulos e grânulos citoplasmáticos finos com uma coloração rosa-azulada⁷. Esta população de leucócitos faz parte do sistema imune inato e a sua principal função é a fagocitose e a destruição de microrganismos patogénicos¹³.

Os eosinófilos (Figura 5: B) tem um núcleo constituído por 2 a 3 lóbulos e contem grânulos citoplasmáticos mais grosseiros com uma coloração vermelha. Estas células desempenham um papel importante na resposta imunológica alérgica e contra parasitas⁷.

Relativamente aos basófilos (Figura 5: C) encontram-se numa pequena percentagem no sangue periférico. O núcleo é composto por 3 lóbulos e o citoplasma contém grânulos basófilos de cor negra ricos em heparina e histamina⁷.

No que diz respeito aos monócitos (Figura 5: D), estes são considerados as células de maior tamanho no conjunto dos leucócitos. O núcleo dos monócitos pode ser em forma de rim ou oval e o citoplasma contém granulações finas de cor cinzento-azulado, e podem conter ou não vacúolos⁷.

Por último, os linfócitos (Figura 5: E) são constituídos por um núcleo oval corado de roxo e por uma pequena porção de citoplasma em volta¹⁵. A população de linfócitos pode ser dividida em linfócitos B, Linfócitos NK e linfócitos T.

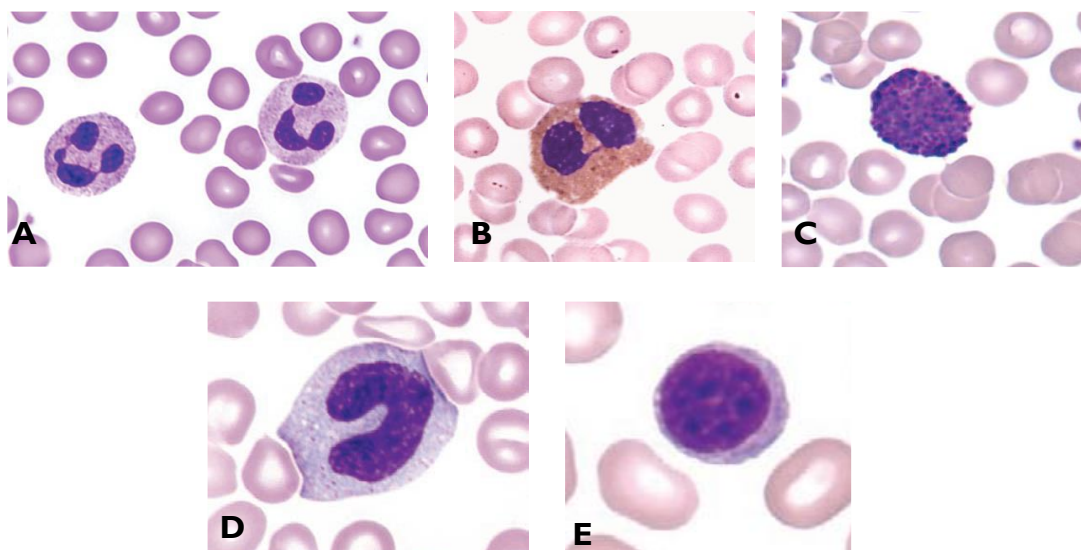


Figura 5: Morfologia das diferentes populações de leucócitos num esfregaço de sangue periférico. (A) Morfologia representativa de neutrófilos; (B) Morfologia representativa de eosinófilos; (C) Morfologia representativa de basófilos; (D) Morfologia representativa de monócitos; (E) Morfologia representativa de linfócitos. Adaptado de^{13;15}.

6.5.1. Serie leucocitária: alterações morfológicas

A avaliação do esfregaço sanguíneo é feita por equipamentos automatizados de microscopia e permitem identificar alterações morfológicas nos leucócitos que podem estar associadas a diversas etiologias. No entanto, surgem algumas limitações no uso destes equipamentos, uma vez que, nem sempre conseguem distinguir corretamente todas as células, assim como, identificar alterações morfológicas. Desta forma, a validação final dos resultados pelo patologista clínico é essencial para identificar algum tipo de anomalia nas células que o aparelho não tenha detetado.

Seguidamente, são descritas algumas das alterações leucocitárias que poderão aparecer no esfregaço de sangue periférico:

Neutrófilos hipersegmentados



Figura 6: Neutrófilo Hipersegmentado.
Adaptado de⁴.

Neutrófilos que apresentam 5 ou mais lóbulos e estão frequentemente associados a anemias megaloblásticas (défice de vitamina B12 e/ou ácido fólico) (Figura 6). Além disso, estão associados a síndromes mielodisplásicas, quimioterapia, ao uso de corticoides e em casos de hipersegmentação hereditária.

Corpos de Döhle



Figura 7: Neutrófilo com Corpo de Döhle
Adaptado de⁴.

São corpos de inclusão com coloração azul-clara que resultam de agregados de ácido desoxirribonucleico do retículo endoplasmático rugoso, geralmente observados em neutrófilos (Figura 7) e com menos frequência em monócitos e linfócitos. O surgimento dos corpos de Dohle pode estar relacionado com as infeções virais ou bacterianas².

Granulócitos hipossegmentados

Este tipo de anomalia é característico da doença de *Pelger-Huët* em que morfológicamente os granulócitos apresentam o núcleo hipossegmentado que pode ser oval ou bilobado com dois lóbulos em forma de óculos (Figura 8). A doença de Pelger-Huet é uma doença autossômica dominante rara, em que ocorre um defeito na maturação dos neutrófilos pela mutação no

gene da lamin B. No entanto, pode ocorrer a presença ocasional de neutrófilos bilobados em

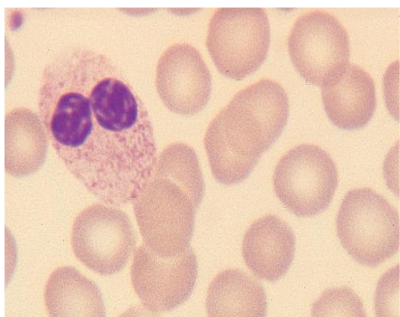


Figura 8: Neutrófilo bilobado (Anomalia de Pelger-Huët). Adaptado de ⁴.

algumas situações clínicas que podem estar associadas a infecções agudas, indução por fármacos e em síndromes mielodisplásicas. Apesar de ser uma doença benigna em que a função da célula não é alterada é importante distinguir entre a forma benigna da doença Pelger-Huet da anomalia adquirida ou pseudo-Pelger-Huet^{6;10}.

Linfócitos atípicos

Linfócitos que contêm alterações morfológicas não específicas. Este tipo de alterações podem

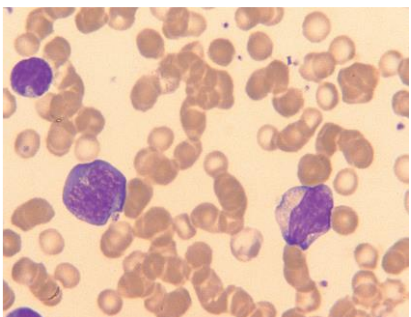


Figura 9: Morfologia representativa de linfócitos atípicos. Adaptado de ⁴.

ser um aumento no tamanho celular, imaturidade do núcleo, contorno do núcleo irregular, podem conter nucléolos, granulação e/ou vacuolização citoplasmática (Figura 9). A etiologia mais comum associada ao aparecimento de linfócitos atípicos é a mononucleose infecciosa causada pelo vírus Epstein-Barr⁴.

Blastos

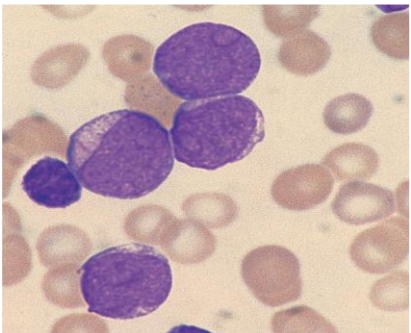


Figura 10: Morfologia de blastos. Adaptado de ⁴.

São células imaturas indiferenciadas que podem ter origem linfoide ou mieloide (Figura 10). A determinação da linhagem das células blásticas é feita recorrendo às técnicas microscopia (morfologia), imunofenotipagem que é realizada através da técnica de citometria de fluxo, citogenética e análise molecular⁷.

6.6. Hemóstase

A hemóstase consiste num conjunto de mecanismos que permite prevenir e/ou interromper uma hemorragia, por exemplo através da formação de um coágulo sanguíneo.

Todavia tem de haver um equilíbrio entre a produção do coágulo e a sua destruição que é conseguida através dos mecanismos de coagulação juntamente com o processo de fibrinólise.

Os principais intervenientes no processo hemostático são as plaquetas, os fatores de coagulação, os inibidores da coagulação, o sistema fibrinolítico e os vasos sanguíneos. O processo de reparação da lesão vascular inicia-se pela vasoconstrição da zona lesada do vaso sanguíneo. De seguida ocorre a adesão plaquetar ao subendotélio, pela exposição do fator de Von Willebrand na superfície do vaso.

O processo de coagulação é iniciado pelo fator tecidual (TF), que é expresso na parede do vaso sanguíneo, que se liga ao fator VII no plasma. O complexo VII-TF vai desencadear uma cascata de reações que podem ocorrer pela via intrínseca e pela via extrínseca, e que culminam com a formação de um polímero insolúvel de fibrina. Por fim, é ativado o mecanismo de fibrinólise que tem a finalidade de dissolver o coágulo formado de modo a não comprometer o normal fluxo sanguíneo.

A avaliação laboratorial da hemóstase permite avaliar as diferentes patologias relacionadas com possíveis defeitos no processo hemostático, bem como a monitorização da terapêutica antitrombótica. Desta forma, para se proceder ao estudo a coagulação é necessária uma amostra de sangue total que é colhida para um tubo que contém anticoagulante citrato de sódio na proporção 1:9 (anticoagulante: sangue)⁷.

6.6.1. Metodologias associadas à Hemostase

No laboratório do CHUC é utilizado um autoanalisador ACL TOP 700 que permite a análise de vários parâmetros tendo como base a três metodologias: método coagulimétrico, método cromogénio e o método imunológico.

O método coagulimétrico consiste na medição do tempo de coagulação, ou seja, até se obter o coágulo de fibrina. A determinação do coágulo é feita pela medição da turbidez a 671nm¹⁹. Esta metodologia é utilizada na medição dos diferentes fatores envolvidos na cascata de coagulação.

O método cromogénio é utilizado no SPC-CHUC para a deteção do fator X, proteína C, antritrombina e o plasminogénio. Este método consiste em detetar o analito presente na amostra através da reação com um substrato cromogénio. Desta reação resulta um composto corado denominado de cromóforo que é detetado por espectrofotometria a 405nm.

Por último, o método imunológico, é utilizado para a deteção da concentração do analito presente na amostra do doente utilizando um anticorpo monoclonal revestido com partículas de latex. Na presença do analito vai ocorrer ligação antigénio-anticorpo, ou seja, anticorpo vai se ligar ao analito presente na amostra e conseqüentemente ocorre aglutinação das partículas

de látex. A deteção é feita por turbidimetria em que ocorre uma diminuição da intensidade de luz transmitida que advém da dispersão de luz pelos complexos formados²⁰.

6.6.2. Testes de *screening*

Os testes de *screening* para a avaliação laboratorial da hemóstase têm como base o modelo clássico da cascata de coagulação que pode ser subdividido em via extrínseca, via intrínseca e via comum. Seguidamente são apresentados os principais parâmetros realizados no SPC-CHUC para avaliação da hemóstase.

6.6.2.1. O tempo de Protrombina (TP)

O Tempo de Protrombina é um teste que permite determinar o tempo, em segundos, necessário para a formação de um coágulo de fibrina após a adição de tromboplastina ou de uma mistura sintética de fator tecidual com lípidos, à amostra. Seguidamente adiciona-se cloreto de cálcio e inicia-se a contagem de tempo até à deteção da formação de fibrina.

O Tempo de Protrombina (TP) permite avaliar a eficiência da via extrínseca e comum da coagulação. Tempos prolongados de TP podem estar relacionados com a inibição ou deficiência na síntese nos fatores de coagulação nomeadamente fator VII, X, V, II e fibrinogénio. Além disso, permite a monitorização terapêutica com anticoagulante orais antagonistas da vitamina K, como por exemplo a varfarina².

De forma a padronizar o controlo com anticoagulantes orais, uma vez que a tromboplastina utilizada por cada laboratório apresenta algumas variações dependendo de cada casa comercial, foi introduzida pela organização mundial de saúde o INR (*International Normalized Ratio*), que tem a finalidade de padronizar os valores obtidos pelo TP e corresponde à seguinte equação²:

$$INR = \left(\frac{TP \text{ doente}}{TP \text{ controlo}} \right)^{ISI}$$

6.6.2.2. Tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPa)

O teste consiste em adicionar à amostra de plasma componentes ativadores da via intrínseca como a sílica e fosfolípidos que iniciam a fase de contacto. À semelhança do ensaio de TP, no TTPa também é adicionado cloreto de cálcio que dá início à cascata de coagulação.

O TTPa avalia a eficácia dos fatores de coagulação das vias intrínsecas e comuns de coagulação nomeadamente os fatores II, V, VIII, IX, X, XI, XII e fibrinogénio. Tempos

prolongados de TTPa podem estar relacionados com a deficiência nos fatores de coagulação, inibidores de fatores de coagulação e a toma de fármacos anticoagulantes, como a heparina.

6.6.2.3. Testes de mistura

Os testes de mistura são efetuados em situações em que existe um prolongamento do TP ou do TTPa, com o objetivo de determinar se esse aumento é devido a défices de fatores de coagulação ou se é pela presença de inibidores de fatores de coagulação. Neste sentido, é feita a mistura de plasma normal com o plasma do doente na proporção de 1:1 e procede-se à medição do tempo de coagulação. Assim, se os resultados obtidos estiverem dentro dos intervalos de referência sugere que existe uma deficiência nos fatores de coagulação que foram corrigidos pela adição de plasma normal. Por outro lado, se os tempos de coagulação permanecerem prolongados é sugestivo que seja pela presença de inibidores².

6.6.2.4. Fibrinogénio

O fibrinogénio é uma glicoproteína presente no plasma essencial para a formação do coágulo de fibrina.

A metodologia utilizada para o doseamento do fibrinogénio plasmática baseia-se na técnica de Clauss. Esta técnica consiste em adicionar ao plasma diluído do doente uma solução que contém uma elevada concentração de trombina e mede-se o tempo, em segundos, desde a junção de trombina até à formação da fibrina. Tempos reduzidos indicam uma elevada atividade do fibrinogénio que está fortemente relacionado com maior risco de formação de coágulo.

O doseamento do fibrinogénio dá indicações de alterações da atividade do fibrinogénio plasmático e é útil no diagnóstico diversas patologias como: hipofibrinogénemia, desfibrinogénemia, coagulação intravascular disseminada, fibrinólise primária, entre outras²¹.

6.6.2.5. Teste de fibrinólise: D-dímeros

Os D-dímeros resultam do processo de fibrinólise pela degradação do fibrinogénio pela plasmina, sendo libertados para a circulação sanguínea.

Níveis elevados de D-dímeros podem estar associados a episódios de tromboembolias venosas ou pulmonares, no entanto pode estar associado a outro tipo de patologias como cancro e além disso, o seu valor pode aumentar fisiologicamente com a idade, na gravidez ou até mesmo em processos inflamatórios.

Desta forma o doseamento dos D-dímeros tem valor preditivo negativo para a exclusão de diagnóstico de eventos trombóticos, ou seja, um teste negativo é sugestivo de ausência de quadro clínico para tromboembolismo²².

7. Microbiologia

A microbiologia tem como objetivo o estudo dos diferentes microrganismos, como bactérias, fungos, parasitas e vírus, e a sua relação com meio ambiente e o ser humano. A verdade é que estes desempenham um papel importante na defesa do organismo humano contra possíveis patógenos, a denominada microbiota humana.

No entanto, em certas situações como por exemplo, estados de imunossupressão em que os indivíduos se encontram mais suscetíveis a desenvolver infecções podem levar a que microrganismos oportunistas, se tornem patógenos. Em determinadas situações este tipo de microrganismos podem pertencer à própria flora comensal do indivíduo ou podem ser agentes patógenos exógenos. Contudo, e apesar de se encontrarem em minoria, existem microrganismos que são sempre patógenos.

Desta forma o laboratório de microbiologia tem o importante papel de conseguir identificar o agente patógeno responsável pela infecção e quais os agentes antimicrobianos mais adequados para o eliminar.

Contudo, existem situações em que a amostra pode estar contaminada com a própria flora comensal, não sendo este o agente causador de infecção, daí ser importante no laboratório existir pessoal técnico especializado que saiba se o microrganismo identificado é de valorizar ou não.

7.1. Meios de cultura

A inoculação das amostras nos meios de cultura vai possibilitar o crescimento e isolamento dos microrganismos de modo que se consiga detetar e identificar o possível agente causador da infecção.

Os meios de cultura podem ser sólidos, semi-sólidos e líquidos e são classificados de acordo com a sua função (Tabela 6).

Tabela 7: Classificação dos diferentes meios de cultura utilizados em microbiologia. Adaptado de 23.

Meios de cultura	Função
Meios ricos ou enriquecidos	Contêm nutrientes que permitem o crescimento da maioria dos microrganismos que não são fastidiosos.
Meios seletivos	Contêm nutrientes necessários para o crescimento dos microrganismos e certos aditivos (corantes, antibióticos) que favorecem a detecção de determinados microrganismos, através da inibição do crescimento de outros.
Meios Diferenciais	Contêm componentes específicos (ex: lactose e indicador de pH) que permitem separar grupos de microrganismos através de alterações que estes causam ao meio (mudança de cor, precipitados).

No setor de microbiologia do SPC-CHUC são utilizados meios de inoculação que podem ser enriquecidos, seletivos ou diferenciais. De seguida, serão referidos mais detalhadamente os principais meios de cultura utilizados neste setor.

7.1.1. Meios líquidos

CBGN (Caldo de Bacilos): caldo de enriquecimento para *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. O selenito de sódio inibe a maioria das *Enterobacteriaceae*.

CM (Caldo Cooked Meet): Meio de enriquecimento, contém aminoácidos e proteínas, essenciais para o cultivo e recuperação de microrganismos anaeróbios.

BHI (Caldo cérebro-coração): caldo extremamente rico e nutritivo, composto por extratos de cérebro e coração, que permite o crescimento de microrganismos exigentes.

7.1.2. Meios Sólidos

BCSA (Meio para *Burkholderia cepacia*): Meio seletivo para o isolamento do complexo *Burkholderia cepacia*, que contém sais biliares e antibióticos como gentamicina, ticarcilina e polimixina B.

CIN (cefsulodina-irgasan-novobiocina): Meio seletivo e diferencial para isolamento de *Yersinia* spp. em amostras de fezes. O meio é suplementado com cefsulodina, novobiocina, Irgasan, sais biliares e cristal de violeta que inibem crescimento de microrganismos da microbiota gastrointestinal. O meio contém manitol que permite diferenciar as bactérias fermentadoras através do indicador de pH (vermelho neutro).

CLED (Cistina, lactose e deficiente em eletrólitos): Meio não seletivo e diferencial, utilizado para o isolamento de agentes patogênicos presentes na urina, pois permite o crescimento da maioria dos organismos causadores de infecções do trato urinário. O meio permite diferenciar as colônias fermentadoras de lactose das não fermentadoras. A deficiência em eletrólitos impede o *swarming* provocado pelo *Proteus* spp.

CNA (Gelose *Columbia* + 5% de sangue de carneiro suplementado com colistina e ácido nalidíxico): meio seletivo para bactérias Gram positivo. A presença de colistina e o ácido nalidíxico inibe o crescimento das *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* spp.

CAM (Meio para *Campylobacter*): Meio seletivo para a recuperação de *Campylobacter* spp. O meio é composto por antibióticos como a vancomicina, trimetoprim, polimixina B, anfotericina B e cefalotina que inibem o crescimento dos microrganismos da microbiota do trato gastrointestinal e de bactérias Gram positivas.

Gelose de sangue: Meio de enriquecimento e diferencial que permite o crescimento de todas as bactérias. Permite diferenciar o tipo de microrganismo de acordo com a hemólise que apresenta.

HAE: Meio seletivo para *Haemophilus* spp., é constituído por gelose de chocolate e o antibiótico bacitracina que inibe o crescimento de bactérias Gram positivas, favorecendo o desenvolvimento de *Haemophilus* spp..

HEK (gelose Hektoen): meio seletivo diferencial para o isolamento de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. Contém sais biliares que inibem as bactérias Gram positivas e retardam o crescimento de algumas *Enterobacteriaceae*. Possui na sua constituição lactose e sacarose o que permite diferenciar as bactérias fermentadoras das não fermentadoras através dos indicadores de pH azul de bromotimol e fucsina ácida. Assim, se os microrganismos forem fermentadores as colônias apresentam uma cor amarelada enquanto que as não fermentadoras são incolores. Contém, também, tiosulfato de sódio e o citrato férrico amoniacal que permitem detetar a produção de sulfureto de hidrogénio (H₂S), originando colônias de centro preto características de *Salmonella* spp..

MH (Muller-Hinton): Meio não seletivo utilizado para realização de testes de suscetibilidade antimicrobiana manuais.

MH-F (Muller-Hinton suplementado com sangue): Meio mais nutritivo utilizado para a realização de testes de suscetibilidade antimicrobiana para microrganismos fastidiosos, manuais.

PVX (PoliViteX): Meio de enriquecimento, não seletivo. O sangue adicionado ao meio base é aquecido originando a lise dos glóbulos vermelhos, tornando o meio castanho, permitindo a libertação de nutrientes como o fator X (hemina) e o fator V (nicotinamida adenina dinucleótido). Este suplemento do meio favorece o isolamento de microrganismos fastidiosos, como *Neisseria* spp. e *Haemophilus* spp..

SGC2 (Sabouraud e clorofenicol): Meio seletivo para o isolamento de fungos. A cloranfenicol e a gentamicina inibem o crescimento das bactérias da microbiota associada à amostra.

SS (Meio para *Salmonella-Shigella*): Meio seletivo e diferencial para o isolamento de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. Este meio contém lactose e sais biliares que inibem o crescimento de bactérias Gram positivo. O indicador de pH, vermelho neutro, permite diferenciar as bactérias fermentadoras de lactose das não fermentadoras. Contém, também, citrato férrico amoniacal que permite detetar a formação de H₂S, através da formação de colónias com um precipitado de centro negro. Este tipo de colónias é característico de *Salmonella* spp..

TSA (Trypticase de soja): O meio não seletivo que permite o crescimento da maioria das bactérias Gram negativas, bactérias Gram positivas não fastidiosas e leveduras. Na sua constituição possui peptonas e caseína que constituem a fonte de nutrientes para os microrganismos e contém cloreto de sódio como estabilizador osmótico. Este meio é utilizado para a realização do controlo do antibiograma.

VCAT (Meio para *Neisseria* spp.): meio seletivo para o isolamento de *Neisseria* spp.. Contém os fatores V e X e ainda um conjunto de antibióticos como vancomicina, colistina B, anfotericina e trimetopim que inibem bactérias Gram positivas, Gram negativas, leveduras e fungos

7.2. Técnicas de inoculação

Para procedermos à inoculação das amostras que chegam ao laboratório podem ser utilizadas várias técnicas de inoculação. A **técnica de esgotamento do produto à superfície de um meio sólido** é utilizada para a grande maioria das amostras biológicas e permite obter colónias separadas. As amostras de urina são inoculadas pela **técnica de sementeira semi-quantitativa** utilizando uma ança de 1µl, permitindo o isolamento e contagem das colónias.

Em amostras como o líquido cefalorraquidiano, que é considerado um líquido estéril de difícil obtenção, a técnica de sementeira utilizada é por **inundação** uma vez que a quantidade de microrganismos presentes é reduzida e se existirem são sempre valorizáveis.

As amostras de cateteres são inoculadas pela **técnica de sementeira de rolamento** em que são “rolados” diretamente na superfície do meio sólido. A **técnica de sementeira em toalha** é utilizada para os antibiogramas manuais porque permite o crescimento homogéneo em toda a placa. Por último, a inoculação das amostras em meios líquidos é feita por **dispersão** diretamente no meio e vai permitir o crescimento e recuperação dos microrganismos²⁴.

7.3. Exame microscópico

O exame microscópico consiste na observação de um esfregaço em lâmina corado pela coloração de Gram. A observação do esfregaço vai permitir detetar a presença de bactérias e/ou leveduras, leucócitos e células epiteliais²³.

A coloração de Gram é considerada uma coloração diferencial que permite distinguir entre bactérias Gram positivo de bactérias Gram negativo. O primeiro corante a ser utilizado é o violeta de cristal, um corante primário que vai corar o material de roxo. De seguida retira-se o excesso de corante e coloca-se o soluto de lugol, que é designado por mordente, que forma um complexo insolúvel com o corante primário e estabiliza a coloração. Por último, adiciona-se o álcool-acetona que atua como diferenciador. As bactérias Gram positivo têm a parede celular com menor conteúdo lipídico e maior quantidade de peptidoglicano e quando expostas ao agente diferenciador conseguem reter o violeta de genciana. Por outro lado, as bactérias Gram negativo têm uma maior quantidade lípidos e uma fina camada de peptidoglicano e quando expostas ao agente diferenciador a parede bacteriana fica fragilizada e perdem o primeiro corante.^{4:5}

Por último, é adicionado o corante de contraste, a safranina, que vai corar as bactérias Gram negativo de rosa, enquanto que as bactérias Gram positivo permanecem com uma coloração roxa.

7.4. Identificação dos microrganismos

A identificação dos microrganismos é feita de modo automatizado no aparelho MALDI Biotyper[®] pela técnica de MALDI-TOF que se baseia no princípio de espectrofotometria de massa por dessorção/ionização a laser. Na placa, com auxílio de uma ansa, é colocado 1 µL de uma colónia isolada do microrganismo em estudo juntamente com uma matriz. A placa é colocada dentro do aparelho onde vai incidir um feixe de luz que vai permitir a ionização da amostra transformando-a em matéria volátil. Após a etapa de ionização, os iões presentes são conduzidos por campos elétricos. As moléculas de diferentes massas e cargas movem-se a diferentes velocidades até atingirem o tubo-analisador de massa, que os separa consoante o ratio carga/massa, convertendo essa informação num espetro. Assim, cada microrganismo tem um espetro que lhe é característico. Deste modo, o aparelho compara o espetro obtido com a base de dados, permitindo a identificação do microrganismo.

Uma das maiores vantagens da técnica de MALDI-TOF é a rapidez na obtenção dos resultados, uma vez que no espaço de 30 minutos é possível identificar os microrganismos em estudo²³.

7.4.1. Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA)

Após a identificação do microrganismo é realizado o teste de suscetibilidade antimicrobiana que tem como objetivo avaliar o efeito dos agentes antimicrobianos no crescimento/viabilidade do agente patogénico.

Desta forma, o TSA vai permitir a escolha do agente antimicrobiano, assim como da dosagem mais adequada, de forma a administrar uma terapêutica mais eficaz para o tratamento do doente. A interpretação dos resultados é posteriormente feita de acordo com as normas da *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)* e *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*²³.

7.4.1.1. TSA manual

O TSA manual pode ser feito pelo método de difusão por disco ou por E-teste. O TSA por difusão em disco é baseado no método de Kirby-Bauer. Primeiramente é preparada uma suspensão bacteriana, numa solução com soro fisiológico, com uma turbidez de 0,5 da escala

de McFarland De seguida, a suspensão bacteriana é inoculada na gelose de Mueller-Hinton, pela técnica da sementeira em toalha, e os discos que contêm os antibióticos impregnados são aplicados sobre a superfície da placa, tendo em consideração que sua aplicação deve ter uma distância mínima entre os discos de modo que não haja sobreposição dos halos de inibição.

O método do E-teste consiste na aplicação de tiras que têm um gradiente de concentrações de agentes antimicrobianos, permitindo a determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI). Após incubação das placas, vai haver formação de uma zona de inibição de crescimento, em forma de elipse, em que é possível determinar a CMI que corresponde ao local de interseção da elipse com a tira de antibióticos^{23;25}.

7.4.1.2. TSA automático

O sistema utilizado para a realização do TSA automático é o *WalkAway*. Este aparelho tem diferentes painéis de antibióticos predefinidos. Cada placa contém poços que contêm diferentes concentrações de antibióticos e 2 poços controlo que servem para a validação do teste, tem de ocorrer crescimento nestes 2 poços. A amostra é inoculada na placa e é incubada a 35°C no sistema automático, que faz inicialmente uma leitura e depois após 1h e ao fim de 18h, de modo a avaliar o crescimento bacteriano. A monitorização do crescimento bacteriano é feita de modo a determinar o valor da CMI. Para garantir que a cultura é pura é feito um controlo utilizando a gelose de tripticase de soja ou no caso de organismos mais fastidiosos, tripticase de soja com sangue.

7.5. Amostras biológicas

7.5.1. Urina

As infeções do trato urinário são das infeções mais comuns causadas por bactérias, sendo as mulheres mais suscetíveis devido à anatomia do trato urinário, no qual a uretra encontra-se mais próxima da região anal o que facilita a entrada de microrganismos por via ascendente. Nos homens, este tipo de infeções não é tão frequente e um dos fatores que contribui para a menor suscetibilidade é o facto do fluido prostático presente na urina ter um efeito bactericida, além de que o pH e a osmolaridade é mais elevada o que dificulta a colonização por agentes patogénicos.

As infeções do trato urinário podem ser classificadas de acordo com a região anatómica afetada. Uma infeção do trato urinário inferior engloba a cistite (infeção na bexiga), uretrites (infeção da uretra), cervicites e vaginites na mulher e prostatites no homem. A pielonefrite (infeção nos rins) é considerada mais grave e envolve o trato urinário superior. Os agentes patogénicos mais frequentes neste tipo de infeções são: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus*

spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*²⁵.

Acolheita da urina é normalmente realizada pelo doente e deve ter em atenção os cuidados de assepsia, nomeadamente a lavagem das mãos e da área genital, para que não haja contaminação da amostra pela flora comensal. A colheita deverá ser a primeira urina da manhã, rejeitando a primeira micção, com a recolha do jato intermédio para um contentor estéril.

Quando a amostra de urina chega ao laboratório é colocada no equipamento automatizado UF-5000TM da Sysmex que é utilizado como *screening* para a realização do exame cultural. Este equipamento é um analisador de partículas que permite fazer a contagem dos diferentes elementos que poderão estar presentes na urina como eritrócitos, leucócitos, células epiteliais, bactérias e leveduras.

O exame bacteriológico da urina (urocultura) inicia-se com a homogeneização da amostra que é depois semeada com uma ansa de 1µl no meio CLED e em GS. Ambos os meios são incubados a 37°C durante 18 a 24h, numa atmosfera de aerobiose. Após incubação é observada a morfologia das colónias e procede-se à técnica de MALDI-TOF para identificar o agente etiológico. Posteriormente realiza-se o teste de suscetibilidade aos antibióticos.

As amostras pediátricas são processadas no sistema automatizado HB&L UROQUATTROTM. As amostras de urina são inoculadas em caldos de Muller Hinton e são incubadas a 37°C no equipamento. Este sistema utiliza a tecnologia de dispersão da luz que permite detetar a presença de bactérias na amostra. Além disso, o equipamento possibilita que ao longo do tempo seja feita a monitorização do crescimento bacteriano através da visualização das curvas de crescimento.

7.5.2. Fezes

No caso de suspeita de infeções gastrointestinais é pedido pelo clínico o exame cultural das fezes que consiste na pesquisa de *Salmonella* spp., *Shigella*, *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter jejuni*.

Para o diagnóstico laboratorial destas infeções, são colhidas pelo utente 3 amostras de fezes em dias diferentes. As amostras devem ser colhidas para contentores estéreis e enviadas para o laboratório o mais rápido possível. Após receção no laboratório, é feita a observação macroscópica da consistência das fezes e da presença de sangue ou muco.

Para a cultura da amostra de fezes utilizam-se meios seletivos com propriedades diferenciais para evitar o crescimento da flora comensal e favorecer o crescimento das bactérias enteropatogénicas.

Nas coproculturas é feita a pesquisa de pesquisa de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. inoculando as amostras de fezes nos meios Hektoen, SS e no caldo de bacilos Gram negativo. Estes meios são incubados a 37°C em atmosfera de aerobiose durante 18 a 24h.

Após o período de incubação procede-se à observação das colónias. No meio Hektoen as colónias incolores, não fermentadoras de lactose, são sugestivas de *Shigella* spp., enquanto que colonias incolores com centro preto são sugestivas de *Salmonella* spp., uma vez que esta bactéria produz H₂S que ao reagir com os iões ferro, do citrato ferro amoniacal presente no meio, origina um precipitado negro. Da mesma forma, no meio SS colónias incolores são sugestivas de *Shigella* spp. enquanto colónias incolores de centro negro (produção de H₂S) são sugestivas de *Salmonella* spp. Após incubação, o caldo de bacilos Gram negativo é repicado para os meios SS e Hektoen.

Além disso, também podem ser pesquisados nas fezes outros microrganismos como a *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter* spp. Para isolamento *Yersinia* spp utiliza-se o meio CIN que é incubado numa atmosfera aeróbia a uma temperatura de 37°C durante 18 a 24h. O meio CAM é o meio utilizado para a pesquisa de *Campylobacter* spp. e é incubado a 42°C durante 48h em atmosfera microaerofilia.

7.5.3. Sangue

O sangue é considerado um líquido biológico estéril, pelo que o isolamento de um microrganismo a partir de uma hemocultura corresponde, geralmente, ao agente causador da infeção. Estas infeções são designadas por septicémias e são consideradas das patologias mais graves uma vez que os agentes patogénicos podem propagar-se pelo organismo levando a uma infeção amplamente disseminada.

No ato da colheita recomenda-se desinfetar bem a área da pele para que não ocorra contaminação da amostra pelas bactérias comensais da pele nomeadamente *Staphylococcus epidermidis*. A colheita é feita em garrafas de hemocultura, mais especificamente duas a três garrafas de hemocultura, que devem ser colhidas individualmente de locais diferentes, ao longo de 24 horas²³.

Uma vez que a quantidade de microrganismos em circulação é normalmente baixa, torna-se importante colher cerca de 10 mL a 30 mL de sangue em adultos. No entanto, a quantidade de sangue colhida em crianças é feita consoante o peso. Assim, um microrganismo isolado a partir de três amostras diferentes, sugere que este poderá ser o agente causador de infeção e não uma contaminação da amostra.

As garrafas de hemocultura ao chegarem ao laboratório são colocadas no sistema automatizado BacT/ALERT® da bioMérieux, e incubam-se a 37°C durante 5 dias. Este sistema deteta os níveis de produção de CO₂ através de uma membrana sensível às alterações de pH, presente no fundo da garrafa de hemocultura. Desta forma, o sensor colorimétrico altera a cor consoante a alteração do pH, ou seja, quando ocorre um aumento na produção de CO₂ pelos microrganismos, ocorre uma diminuição no valor de pH com a mudança de cor cinza para amarelo, que é detetada pelo aparelho pela luz refletida.

Desta forma, o aparelho permite monitorizar o crescimento bacteriano durante 5 dias. As hemoculturas são consideradas negativas quando após os 5 dias de incubação não houve crescimento bacteriano.

Se o equipamento indicar que uma das hemoculturas é positiva, é feita uma repicagem para o meio GS que é incubado a 37°C em atmosfera capnófila (de 5% de CO₂), durante 24 a 48h. Paralelamente, é realizado um esfregaço em lâmina para coloração de Gram.

No caso de não haver crescimento na GS, pode-se estar na presença de um microrganismo fastidioso, mais exigente ou anaeróbio, sendo necessário fazer a repicagem a partir da hemocultura para placas de PVX, em aerobiose e anaerobiose. Se houver crescimento a valorizar, é feita a identificação e o TSA. Os microrganismos mais comuns associados a situações de bacteriémia são *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella spp*²⁵.

No caso de uma situação emergente como nas crianças ou quando há indicação de sépsis, recorre-se ao sistema automatizado Accelerate Pheno® que realiza a identificação do microrganismo e respetivo TSA, permitindo reduzir o tempo de resposta.

7.5.4. Cateter

Os cateteres são dispositivos médicos que são colocados nas veias periféricas e servem para administrar medicamentos e fluídos, podendo permanecer colocados por semanas ou meses. Uma das principais desvantagens da sua utilização é o facto de constituírem uma das principais vias de infeção hematogénica. Dado que os cateteres estão propensos a ser colonizados pela microbiota da pele do doente, podendo dar origem à formação de biofilmes e conseqüentemente a situações mais graves, como septicémias. Desta forma, é essencial que haja uma correta desinfeção do local de inserção de modo a evitar estas situações mais graves.

Quando a amostra de cateter chega ao laboratório procede-se à sua inoculação no meio GS pela técnica do rolamento e em meio líquido BHI. Os meios são incubados a 37°C durante 18 a 24 horas.

7.5.5. Produtos do trato respiratório

O trato respiratório pode ser dividido em trato respiratório inferior e trato respiratório superior.

O trato respiratório superior que engloba a cavidade nasal, nasofaringe, orofaringe e laringe é constituída pela microbiota comensal que protege o hospedeiro de sofrer infeções por microrganismos patogénicos, pelo facto de competirem pelos nutrientes e pelos mesmos recetores celulares que os microrganismos patogénicos²³.

Por outro lado, o trato respiratório inferior constituído pela traqueia e brônquios não tem microbiota comensal associada. As infeções do trato respiratório inferior podem ocorrer devido à inalação de aerossóis de microrganismos patogénicos, pela aspiração de conteúdo gástrico ou por via hematogénea.

Para o diagnóstico laboratorial podem chegar ao laboratório amostras como expetorações, lavados e aspirados brônquios.

Na obtenção das amostras de expetoração poderá haver contaminação com saliva, desta forma é importante avaliar a qualidade da amostra, quantificando-se o número de células epiteliais, o número de leucócitos e o tipo de flora. Para isso é feito um esfregaço, a coloração de Gram e observação ao microscópio. De realçar que as amostras que apresentem um valor superior a 25 células epiteliais por campo devem ser rejeitadas²⁵.

Para obter os aspirados brônquios e os lavados bronco-alveolares são utilizadas técnicas mais invasivas. Para o exame cultural utilizam-se os meios GS e o meio de *Haemophilus* e incuba-se a 37°C durante 24 a 48 horas. Além disso, em doentes com Fibrose Quística, que estão propensos a desenvolver infeções respiratórias, devem ser inoculados os meios BCSA para a pesquisa de *Burkholderia cepacia* e SGC2 para a pesquisa de fungos.

7.5.6. Exsudados vaginais e exsudados uretrais

O trato vaginal é colonizado por uma variedade microrganismos e leveduras, apresentando principalmente lactobacilos e bacilos Gram positivo que desempenham um papel protetor da mucosa vaginal. No entanto, ao longo do tempo vão ocorrendo flutuações na composição da microbiota vaginal devido a alterações hormonais, idade, práticas sexuais e uso de fármacos antimicrobianos²³. Quando ocorre um desequilíbrio na microbiota vaginal pode ocorrer o crescimento de patógenos oportunistas dando origem a infeções endógenas, sendo as mais comuns as vaginoses bacterianas por *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma* spp., e as vaginites (inflamação da mucosa) causadas por *Candida albicans*. Nas infeções exógenas, mais

propriamente as doenças sexualmente transmissíveis, os agentes patogénicos usualmente pesquisados são *Clamidia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Trichomonas vaginalis*^{23;25}.

A colheita das amostras é feita com uma zaragatoa que é armazenada em meio de transporte adequado de modo a garantir a viabilidade dos microrganismos. Quando a amostra chega ao laboratório é feita uma preparação a fresco com o objetivo de observar a presença de trofozoítos flagelados de *Trichomonas vaginalis* e/ou de leveduras. Para o exame cultural é utilizado o meio GS e VCAT que permite o crescimento de *Neisseria gonorrhoeae* e o meio CNA que permite o crescimento de cocos Gram positivo. A incubação das culturas é feita durante 18 a 24 horas a 37°C. Além disso, é realizado o esfregaço em lâmina para coloração de Gram com o objetivo de avaliar a flora bacteriana, presença de células epiteliais e leucócitos.

Por último, a pesquisa de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* é realizada recorrendo a um kit comercial que tem como base as características bioquímicas dos microrganismos e vai permitir a sua identificação e respetivo TSA.

7.5.7. Exsudados de feridas

Para o diagnóstico laboratorial das infeções bacterianas da pele e dos tecidos moles, a colheita de amostras da superfície da pele ou das úlceras é feita utilizando zaragatoa após limpeza do local da ferida com soro fisiológico. No caso de pus de abcesso e exsudados purulentos, as amostras são colhidas por aspiração em condições de assepsia.

Após a chegada ao laboratório é feito um esfregaço para coloração de Gram e inoculação em GS. Para os exsudados purulentos, pus de abscessos e aspirados de feridas, onde é frequente encontrar anaeróbios, a inoculação das amostras é feita em meio de Cooked Meat para recuperação desses microrganismos. As culturas são todas incubadas durante 24h a 37°C. Após incubação, as primoculturas são observadas e a sua interpretação deve ter em conta o local da colheita, dado que os exsudados com zaragatoas de feridas mais superficiais estão muitas vezes sujeitas à contaminação pela flora comensal da pele, não sendo estes microrganismos de valorizar em termos clínicos.

Os microrganismos frequentemente responsáveis por estes tipos de infeções são *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* beta-hemolítico²⁵.

7.5.8. Líquido Cefalorraquidiano (LCR)

O sistema nervoso central é constituído pelo cérebro e medula espinhal os quais são protegidos pelo crânio e coluna vertebral, respetivamente, e três camadas de meninges, dura-mater, aracnoide e pia mater que tem uma ação protetora. No espaço subaracnoideo, entre a aracnoide e pia mater, circula o líquido cefalorraquidiano que é produzido a partir de uma complexa rede de capilares especializados no plexo coróide.

O LCR é um líquido incolor e estéril, sendo constituído por proteínas (15-150mg/dL em adultos), glicose (30-120mg/dL em adultos), neutrófilos (0-15% em adultos), monócitos (10-40% em adultos) e linfócitos (60-80% em adultos). No caso dos recém-nascidos estes valores são sempre mais elevados.²³ Em situações em que existe infeção bacteriana no SNC, frequentemente ocorre um aumento de proteínas e uma diminuição no valor de glicose devido ao metabolismo das bactérias. Dependente do local ou locais onde ocorre a infeção, estas podem ser designadas por encefalites (inflamação do cérebro), encefalomielite (inflamação do cérebro e medula espinhal), meningite (inflamação das meninges) e meningoencefalite (inflamação do cérebro e das meninges)²³.

Alguns dos agentes bacterianos responsáveis pelas infeções do SNC são *H. influenzae*, *Listeria monocytogenes* *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae*²⁵.

A colheita do LCR é essencial para avaliar a presença de agentes patogénicos causadores de infeção do SNC. A colheita é feita em ambiente hospitalar por punção lombar. O LCR deve permanecer à temperatura ambiente até ser processado. Após a chegada ao laboratório é feita uma análise macroscópica onde se avalia a turvação e a cor do LCR. De seguida, as amostras são centrifugadas (10 min 2500rpm) uma vez que a concentração dos microrganismos no LCR é reduzida. Com o sedimento obtido é feito um esfregaço para coloração Gram e procede-se à inoculação dos meios GS, PVX e meio líquido BHI (para recuperação de organismos fastidiosos). As culturas são incubadas a 37°C durante 24 a 72h.

Também é realizada a análise bioquímica e citológica do LCR que permite avaliar a presença de proteínas, a concentração de glicose, contagem de leucócitos e o tipo de células predominantes.

7.5.9. Outros líquidos

Os líquidos das cavidades corporais como pleural (reveste a cavidade torácica), peritoneal (localizado no abdómen) e sinovial (espaço articular) são considerados líquidos estéreis. Assim, qualquer microrganismo que se desenvolva nestes locais deve ser valorizado. A colheita das amostras é feita em assepsia por aspiração e para recipiente seco e estéril.

O processamento das amostras de líquido pleural e sinovial inicia-se com um esfregaço para coloração Gram. Os meios utilizados são GS, PVX e o meio líquido de enriquecimento BHI. No caso deste último apresentar turvação após as 24h de incubação, deve ser feita uma repicagem para os mesmos meios sólidos utilizados anteriormente. Nas amostras de líquido peritoneal, também é feito um esfregaço para coloração Gram, e os meios utilizados são GS, PVX e meio líquido Cooked Meat que permite a recuperação de microrganismos anaeróbios. As culturas são incubadas a 37°C durante 24 a 48h.

7.6. Micobactérias

As micobactérias são consideradas bacilos aeróbios estritos com uma parede com uma elevada percentagem em glicolípidos (ácidos micólicos). Esta característica confere-lhes o nome de bacilos ácido-alcool-resistentes (BAAR). *Mycobacterium tuberculosis* complex é constituído por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, entre outras. A primeira micobactéria a ser descrita foi *Mycobacterium tuberculosis* que é o agente etiológico da tuberculose pulmonar, um problema grave de saúde pública. Esta micobactéria é geralmente inalada através do contacto com indivíduos que têm a doença ativa e excretam bacilos viáveis através da tosse ou espirros. A dose infecciosa é extremamente baixa, um bacilo viável é suficiente para causar doença. A inalação de bioaerossóis que contêm as micobactérias rapidamente atingem os alvéolos pulmonares, local onde se multiplicam.

7.6.1. Processamento das amostras

Ao laboratório de micobacteriologia podem chegar diversas amostras como expetorações e aspirados bronco-alveolares, sangue, LCR, fezes e biopsias. O primeiro passo do processamento das amostras é a descontaminação e concentração de forma a eliminar a microbiota associada.

No processo de descontaminação é utilizada uma solução de N-acetil-L-cisteína (NALC) juntamente com hidróxido de sódio (NaOH). O NaOH ao ligar-se ao NALC dá origem ao composto N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sódio (NALC-NaOH) que atua como agente mucolítico ajudando a fluidificar a amostra.

Além disso, é também adicionado o citrato de sódio que tem como função impedir a inativação do NALC ao ligar-se aos metais pesados presentes na amostra. Posteriormente é adicionado às amostras uma solução tampão de fosfato, que vai diminuir a ação de NALC-NaOH, e a mistura é centrifugada durante 15 min uma velocidade de 3000xg. O sedimento

que resulta da centrifugação é posteriormente utilizado para se proceder à inoculação dos meios de cultura e realizar o esfregaço para coloração de Kinyoun.

No entanto, existem algumas amostras em que o passo de descontaminação não é necessário ser realizado como é o caso do LCR que é diretamente centrifugado.

No caso das amostras fecais como contém muitos microrganismos associados é necessário fazer um pré-tratamento antes de avançar para a descontaminação. Para tal, retira-se uma porção de fezes, faz-se uma suspensão com água destilada e filtra-se a mistura através de uma gaze. A mistura filtrada é então submetida ao processo de descontaminação.

As amostras de sangue como são colhidas para frascos de hemoculturas são inseridas diretamente no aparelho automatizado BACTEC™ 9120™.

7.6.2. Exame microscópico

O tipo de coloração utilizado no laboratório do CHUC é a coloração Kinyoun que consiste numa modificação da coloração de Ziehl- Neelsen.

A coloração de Ziehl-Neelsen inicia-se com a exposição do esfregaço ao primeiro corante, a fucsina básica concentrada, com aquecimento da lâmina. O aquecimento da lâmina vai permitir a fluidificação da parede das micobactérias de modo a facilitar a entrada do corante na parede celular das micobactérias. Em contraste, na coloração de Kinyoun não é necessário aquecimento, uma vez que o primeiro corante (fucsina básica) contém uma concentração elevada de fenol o que vai permitir que o corante atravesse mais facilmente a parede celular, não sendo necessário aquecimento. De seguida, é feita a lavagem com o agente diferenciador/descolorante, ácido-álcool, que vais descorar todo o material biológico, exceto os BARR²³.

Por último, adiciona-se o segundo corante, o azul de metileno, que vai corar o material descorado com a ação do diferenciador. Na observação ao microscópio é possível observar as micobactérias coradas de rosa e o restante material corado de azul.

7.6.3. Exame cultural

Para o exame cultural são utilizados o meio sólido de *Lowenstein Jensen* e um meio líquido MGIT. O meio MGIT é constituído por um caldo nutritivo Middlebrook 7H9 suplementado com uma solução designada PANTA que consiste numa mistura de antibióticos, polimixina B, anfotericina B, ácido nilidixico, trimetropim e azlocilina. A composição do meio vai favorecer o crescimento das micobactérias e a utilização da mistura de antibióticos vai impedir o crescimento da microbiota associada.

Posteriormente o meio é incubado no sistema automatizado BACTEC MGIT 960 a 37°C que permite a monitorização do crescimento das micobactérias. O meio MGIT contém um sensor de oxigénio que emite fluorescência, ou seja, quando ocorre crescimento bacteriano vai haver consumo de oxigénio e conseqüentemente emissão de fluorescência. Quando uma cultura é positiva é feita a sua confirmação com a realização de um esfregaço para a coloração de Kinyoun e é feita uma inoculação da cultura no meio GS para assegurar que a positividade não é devido a um microrganismo contaminante.

O meio sólido de *Lowenstein Jensen* é constituído por uma mistura de glicerol e ovo, que fornece as proteínas e ácidos gordos necessários para o metabolismo das micobactérias juntamente com o composto verde de malaquite que inibe o crescimento das bactérias Gram positivo. Este meio permite a observação macroscópica das colónias de *Mycobacterium* spp.

Uma vez que as micobactérias apresentam um crescimento lento, a incubação do meio Lowenstein Jensen é feita durante 6 semanas a 37°C com a observação diária do crescimento de colónias.

As garrafas de hemoculturas são colocadas em incubação diretamente no equipamento automatizado BACTEC 9120 a 35°C. Este equipamento permite a monitorização do crescimento bacteriano através da deteção de fluorescência pelo aumento da concentração de CO₂ produzido.

7.6.4. Identificação e TSA

Quando as culturas são positivas, a identificação das bactérias é feita pela técnica de biologia molecular *Polymerase Chain Reaction* (PCR), para a deteção de *M. tuberculosis* complex.

Além disso, são realizados os testes de suscetibilidade antimicrobiana, essenciais para o tratamento dos doentes que têm tuberculose, no aparelho BACTEC MGIT 960. Os testes de suscetibilidade incluem os fármacos de primeira linha: estreptomicina, isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida.

O aparelho monitoriza o crescimento das micobactérias, durante 10 dias, comparando o crescimento bacteriano no tubo que contém o fármaco com o tubo controlo (sem fármaco) que funciona como controlo positivo.

7.7. Fungos

Os fungos podem-se dividir em fungos filamentosos, leveduras e dimórficos. Os fungos filamentosos são multicelulares e apresentam colónias algodoadas e aveludadas, enquanto as leveduras reproduzem-se por fissão binária e apresentam colónias redondas cremosas, opacas

ou pastosas. Por outro lado, os fungos dimórficos apresentam dimorfismo ligado à temperatura, ou seja, entre 25°C a 30°C apresentam-se na forma filamentosa e a uma temperatura entre 35°C a 37°C apresentam-se na forma leveduriforme.

Clinicamente os fungos podem ser divididos de acordo com o tipo de micoses que provocam: micoses cutâneas, micoses subcutâneas, micoses sistêmicas e micoses causadas por fungos oportunistas.

O correto diagnóstico das infecções fúngicas depende da correta seleção e recolha das amostras, assim como o rápido transporte até ao laboratório que é essencial para assegurar a viabilidade e recuperação dos fungos, uma vez que as amostras contêm não só o agente etiológico causador da infeção, mas também bactérias ou fungos contaminantes que podem crescer mais rapidamente e sobrepor-se a alguns fungos patogénicos de crescimento mais lento.

Ao laboratório podem chegar amostras como cabelos, pelos, sangue, LCR, produtos do trato respiratório, entre outros. A identificação dos fungos é feita de acordo com as suas características macroscópicas, microscópicas e culturais. Para o seu isolamento, as amostras são inoculadas no meio SGC2. A incubação vai depender do tipo de amostra e da suspeita do fungo. Os fungos geralmente crescem a uma temperatura de 30°C, exceto os dermatófitos, em que o meio de cultura é incubado a 25°C durante aproximadamente 2 semanas. De seguida, procede-se à observação macroscópica que tem em conta a forma, textura e cores das colónias. Posteriormente é feita a observação microscópica através de uma preparação a fresco com azul de lactofenol uma porção de colónia e colocar numa lâmina juntamente com azul de lactofenol que nos vai permitir visualizar as estruturas reprodutoras do fungo, assim como, a morfologia dos esporos e das hifas²³.

7.8. Virologia

No SPC-CHUC o setor da virologia está maioritariamente localizado no Hospital Pediátrico de Coimbra. Os equipamentos laboratoriais utilizados neste setor têm como base a técnica de *Polymerase Chain Reaction* em tempo real (PCR em tempo real). Esta técnica consiste na amplificação e simultaneamente a deteção de uma determinada sequência de DNA de interesse. À medida que ocorre a reação de amplificação ocorre emissão de fluorescência que é detetada pelo fluorímetro. Para a amplificação de vírus, primeiro utiliza-se a transcriptase reversa, que converte o RNA vírico em DNA, e posteriormente inicia-se a técnica de RT-PCR.

Os principais sistemas utilizados neste setor são o FilmArray® Torch, Vita-PCR e GeneXpert. O FilmArray® Torch utiliza a técnica de PCR multiplex que permite a detecção em simultâneo de várias sequências de ácidos nucleicos de vários microrganismos. Este sistema é utilizado para a detecção de agentes patogénicos causadores gastroenterites, meningites/encefalites, infeções respiratórias e septicémias. O equipamento Vita-PCR é utilizado para a pesquisa de SARS-CoV-2, assim como o GeneXpert. No entanto, este último também permite a detecção do genoma de alguns microrganismos como *Streptococcus agalactiae*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e toxina de *Clostridium difficile*.

7.9. Serologia

A serologia é o estudo das reações imunológicas, interações antigénio-anticorpo, que ocorrem no soro de um determinado indivíduo. A partir da análise serológica é possível determinar o tipo de anticorpos presentes na amostra, e em caso de infeção permite perceber se é uma infeção aguda, crónica ou se é uma reinfeção. Além disso, possibilita monitorizar o estado evolutivo de uma doença infecciosa. Desta forma, é frequente fazer o estudo das imunoglobulinas IgG e IgM, sendo que as IgM são as primeiras imunoglobulinas a aparecer quando ocorre contacto com o agente infeccioso, podendo ser sugestivo de que o indivíduo está perante uma infeção aguda. Por outro lado, as IgG aparecem mais tardiamente e podem persistir durante toda a vida (infeção passada).

Desta forma, torna-se importante a realização do estudo serológico do doente para se conseguir identificar e quantificar dos anticorpos.

No laboratório do CHUC são utilizadas as seguintes metodologias para o estudo da cinética dos anticorpos:

7.9.1. Imunofluorescência indireta

O ensaio de imunofluorescência indireta consiste num antigénio adsorvido numa lâmina, à qual se junta a amostra do doente. Se a amostra tiver os anticorpos, estes vão-se ligar aos antigénios formando-se complexos antigénio-anticorpo. Os anticorpos que não se ligaram são removidos pela solução de lavagem. Num segundo passo é adicionado um anticorpo anti-globulina humana marcado com fluoresceína que se vai ligar aos imunocomplexos que são observados no microscópio de fluorescência. Esta técnica é utilizada para a quantificação de anticorpos anti-*Rickettsia conorii* IgG e anticorpos anti-*Coxiella burnetii* IgG²³.

7.9.2. Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

A técnica de ELISA é um ensaio imunoenzimático para a detecção de anticorpos presentes nas amostras, nomeadamente para a detecção de anticorpos anti-leptoespira. Este método utiliza antigénio adsorvido numa matriz sólida (placa) ao qual é adicionada a amostra do doente. Na presença de anticorpos na amostra vai haver formação antigénio-anticorpo ao qual é adicionado uma imunoglobulina humana conjugada com uma enzima. Seguidamente é adicionado um substrato (solução cromogénea) que ao ligar-se à enzima vai originar um composto com cor, que é quantificado espectrofotometricamente. Desta forma, existe uma relação de proporcionalidade entre a intensidade de cor produzida e a quantidade de anticorpos presentes na amostra²³.

7.9.3. Ensaio de fluorescência enzimática (ELFA)

A técnica ELFA é utilizada para a determinação de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, bem como os testes de avidéz das IgG. A sua realização é recomendada sobretudo em mulheres grávidas, uma vez que a toxoplasmose constitui risco de morte fetal, principalmente se contraírem a doença nos primeiros meses de gestação. Assim, é importante a sua monitorização ao longo da gravidez²³.

Este método é idêntico à técnica de ELISA, em que ao antigénio adsorvido numa matriz sólida (placa) é adicionada a amostra do doente. Na presença de anticorpos na amostra vai haver formação antigénio-anticorpo ao qual é adicionado uma imunoglobulina humana conjugada com fosfatase alcalina. A detecção deste complexo é feita pela adição de um substrato que ao ligar-se à fosfatase alcalina origina um produto fluorescente que é detetado a 450nm. A fluorescência emitida é proporcional à quantidade de anticorpos presente na amostra.

7.9.4. Ensaio de quimioluminescência (CLIA)

O ensaio de quimioluminescência utiliza partículas magnéticas revestidas com antigénios específicos ao qual se adiciona o soro doente. Na presença de anticorpos estes vão ligar-se aos antigénios, formando-se complexos antigénio-anticorpo. Posteriormente, é adicionado um anticorpo anti-imunoglobulina humana conjugado com um derivado de isoluminol que se vai ligar ao complexo Ag-Ac previamente formado. Após o tempo de incubação é adicionado o reagente que induz a reação de quimioluminescência. A intensidade do sinal luminoso é proporcional à quantidade anticorpos presentes no soro do doente²⁶. Este ensaio é utilizado

para quantificar os anticorpos anti- Citomegalovírus IgG e IgM, anticorpos anti-Epstein-barr-EBNA, anticorpos Epstein-barr-VCA IgG e IgM.

7.9.5. Rosa de Bengala

O teste Rosa de Bengala é utilizado para o diagnóstico de *Burcella* spp. que é uma bactéria intracelular Gram negativa (cocobacilo) responsável pela brucelose. A brucelose é uma doença que pode ser adquirida pelo contacto direto com os animais ou indiretamente pelo consumo de produtos lácteos não pasteurizados. Dado que o seu isolamento é difícil são feitos testes serológicos baseados nos testes de aglutinação²³. O teste da Rosa de Bengala vai permitir a deteção de anticorpos anti-brucella presentes no soro do doente através de uma reação de aglutinação em placa que consiste em misturar a amostra do doente com uma suspensão tamponada de *Brucella abortus*, inativada e corada por Rosa de Bengala.

7.9.6. Reação de Wright

Teste de Wright é feito quando o ensaio da Rosa de Bengala é considerado positivo. Este teste consiste numa reação de aglutinação em tubo que permite quantificar o título do anticorpo presente na amostra do doente. Neste caso realizam-se várias diluições sucessivas do soro do doente onde é adicionada uma suspensão tamponada de *Brucella abortus* inativada, de forma a identificar o título de anticorpo presente na amostra. Se o título for igual ou superior a 1:80 a reação é considerada positiva²³.

7.9.7. Rapid Plasma Reagin (RPR)

Os indivíduos quando infetados pelo *Treponema pallidum*, agente causador da sífilis, produzem o anticorpo denominado dereaginas. A realização deste teste consiste na junção da amostra do doente com o antigénio cardiolípicina-lectina-colesterol contendo partículas de carvão que permitem a visualização macroscópica da floculação²³.

No entanto, o resultado positivo de um teste RPR é um resultado presuntivo sendo necessário fazer a sua confirmação através de um teste treponémico porque outras patologias como o lúpus eritematoso, febre reumática, mononucleose infecciosa, hepatite, podem dar origem a falsos positivos²³.

7.9.8. Treponema Passive Particle Agglutination (TP-PA)

O TP-PA é um teste treponémico que se baseia numa reação de aglutinação com diluições sucessivas. Após diluição das amostras de soro é adicionada uma suspensão de partículas de gelatina sensibilizadas com antígeno de *T. pallidum*. A presença de anticorpos específicos na amostra do doente faz com que as partículas de gelatina aglutinem sendo esta reação de aglutinação visível macroscopicamente²³.

7.10. Parasitologia

As infeções causadas por parasitas estão mais frequentemente associadas a zonas tropicais, no entanto, o aumento das viagens para países endémicos tem contribuído para uma distribuição mais generalizada destas doenças.

Um dos exames mais requisitados pelos clínicos é a pesquisa de parasitas nas fezes. Para a realização deste exame devem-se recolher três amostras diferentes em dias alternado porque a eliminação de ovos, trofozoítos, quistos ou larvas ocorre de modo intermitente. As amostras são processadas com o *kit* comercial ParasiTrap[®], baseado no método de Ritchie. Para tal, é retirada uma porção da amostra fecal que é tratada com formol a 10%, que permite preservar a morfologia do parasita. Posteriormente, é adicionado acetato de etilo que permite uma separação por camadas do conteúdo ficando no sedimento as estruturas parasitárias (ovos, trofozoítos ou quistos). Após centrifugação do sedimento, coloca-se uma gota deste entre lâmina e lamela e observa-se ao microscópico.

Os parasitas mais frequentemente encontrados em infeções gastrointestinais são *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica* e *Ascaris lumbricoides*²⁵.

7.10.1. Amostras Vaginais

A pesquisa de parasitas flagelados em exsudados vaginais ou uretrais, nomeadamente de *Trichomonas vaginalis*, é um exame frequentemente pedido.

Trichomonas vaginalis é um parasita do trato genitourinário e a sua transmissão pode ser por via sexual ou por fómite e pode infetar homens e mulheres. Os principais sintomas na mulher são as vaginites, cervicites e uretrites e nos homens pode causar uretrites e prostatites. Para o diagnóstico laboratorial destas infeções, os exsudados são colhidos com uma zaragatoa e após a chegada ao laboratório procede-se à realização de um exame a fresco, para pesquisa de trofozoítos sob microscópio ótico, na objetiva de 40x.

7.10.2. Sangue

O exame parasitológico sanguíneo também é uma das análises frequentemente pedidas, para o diagnóstico de algumas das doenças parasitárias sanguíneas como a filariase e malária.

Para a sua pesquisa é feito um esfregaço de sangue em gota espessa e esfregaço sanguíneo fino que são posteriormente corados pela coloração de Giemsa. Na gota espessa existe uma maior concentração de amostra que possibilita um aumento da sensibilidade na detecção do parasita.

No esfregaço sanguíneo fino, o sangue é espalhado sobre a lâmina em camada fina e a integridade eritrócitos não é comprometida, após fixação e coloração, o que permite a visualização de parasitas no seu interior. Assim, através da observação da morfologia é possível identificar a espécie do parasita. Na Figura 11 estão representados alguns exemplos de trofozoítos e gametócitos de *Plasmodium* spp encontrados no sangue.

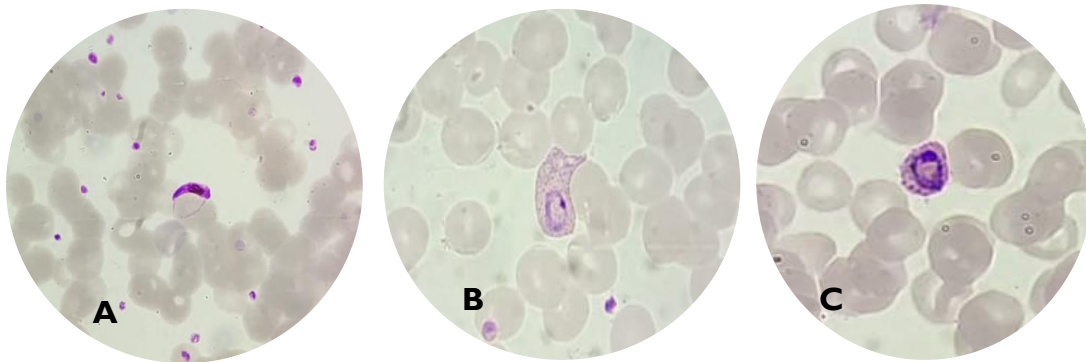


Figura 11: (A) Gametócito de *Plasmodium falciparum*; (B) Trofozoíto de *Plasmodium vivax*; (C) Trofozoíto de *Plasmodium ovale*.
Fonte SPC-CHUC.

8. Casos Clínicos

Caso Clínico I

Doente do sexo feminino com 27 anos de idade, referenciada do Hospital de Aveiro, dá entrada nos SHUC com cefaleias com cerca de 20 dias de evolução. Refere que tem insónias, náuseas, astenia com cerca de 1 mês de evolução e perda ponderal.

Precedeu-se à análise Bioquímica, cujos resultados são apresentados no Anexo I na Tabela 7, onde se verifica um aumento na proteína C reativa, proteína de fase aguda o que é sugestivo que pode estar a ocorrer um processo inflamatório.

O valor de glicose também se encontra acima dos valores de referência, no entanto não é referenciado se a doente se encontra em jejum e de acordo com os critérios da OMS para o diagnóstico de diabetes (Anexo I, Tabela 8) não foi possível confirmar se a doente era diabética.

Pela análise do hemograma (Anexo I, Tabela 9), verifica-se que a doente apresenta uma anemia pela diminuição nos valores de hemoglobina, hematócrito e eritrócitos. No que diz respeito aos valores de VCM e CHCM verifica-se que estes se encontram dentro dos valores de referência o que indica que a doente tem uma anemia normocromica normocítica.

No que diz respeito aos valores apresentados no leucograma (Anexo I, Tabela 10) verifica-se o aparecimento de células imaturas no sangue periférico, neste caso de 96% de blastos o que é sugestivo de uma possível leucemia.

Recorrendo à imunofenotipagem (Anexo I, Figura 18), pela técnica de citometria de fluxo, foram identificados blastos com fenótipo de promielócitos, o que sugere que a doente se encontra com uma **Leucemia Promielocítica Aguda (LPA)**.

De seguida foi feita a análise do esfregaço de sangue periférico (Figura 12):

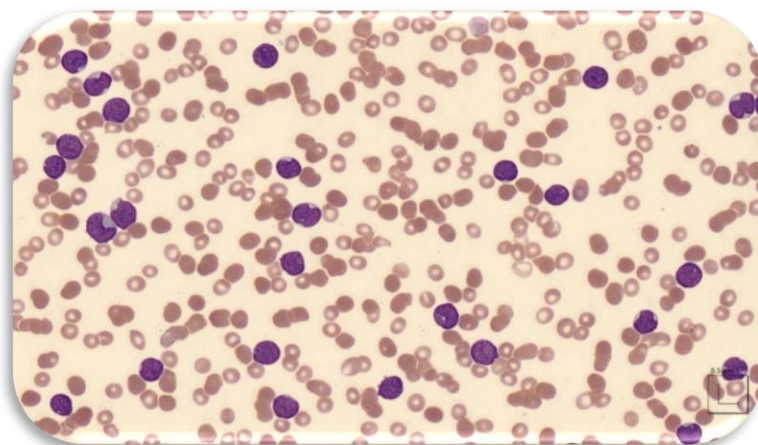


Figura 12: Esfregaço de sangue periférico do doente.

Relatório do esfregaço de sangue periférico: pela observação do esfregaço de sangue periférico verifica-se a invasão de células mononucleadas de pequena e média dimensão, com características sugestivas de imaturidade, morfológicamente compatíveis com blastos, com presença de granulações, raramente com **bastonetes de Auer**.

Algumas das células desta população apresentam **morfologia nuclear com identificação “cup-like”** sugestivo de **Leucemia Mielóide Aguda (LMA)**, (Figura 13).

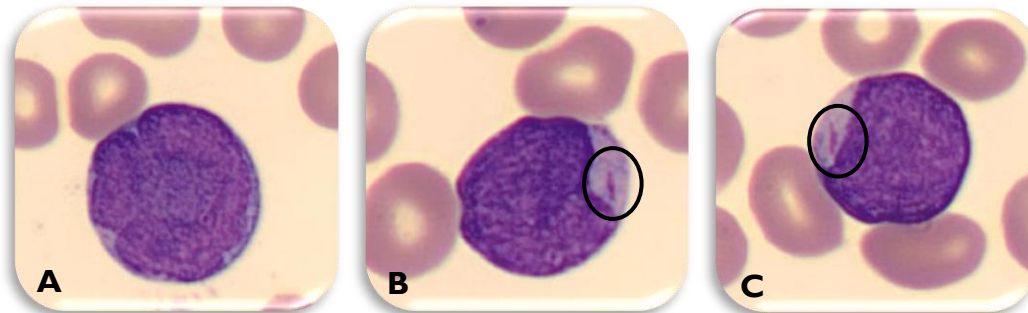


Figura 13: Morfologia das células encontradas no esfregaço de sangue periférico: (A) Blasto em forma “cup-like”; (B) e (C) Blasto com bastonetes de Auer.

Então, mas... Leucemia Promielocítica Aguda ou Leucemia Mielóide aguda?

As leucemias são normalmente doenças agressivas em que ocorre a transformação maligna nas células do sistema hematopoético. As principais causas serão devido a alterações genéticas, envolvidas no controlo de processos bioquímicos, que resultam num aumento da proliferação, redução da apoptose ou bloqueio na diferenciação celular.

A **Leucemia Mielóide Aguda (LMA)** é normalmente definida pela acumulação de blastos ou células hematopoéticas imaturas ($\geq 20\%$) na medula óssea ou sangue periférico. A linhagem celular da qual fazem parte os blastos é definida pela visualização microscópica do esfregaço sanguíneo (morfologia), imunofenotipagem (citometria de fluxo), citogenética e análise molecular. De acordo com os resultados destas metodologias os blastos são classificados como mielóides ou linfóides, além disso, também é possível perceber em que estadió da diferenciação celular se encontram⁷.

Clinicamente a LMA, na maioria dos casos, apresenta uma anemia normocrômica normocítica com trombocitopenia, o que é coerente com o quadro clínico apresentado pela doente. O número de leucócitos encontram-se aumentados e a medula óssea é hiperclular com um número elevado de blastos.

As mutações mais conhecidas da LMA são nos genes *FLT3*, *NPM1* e *DNMT3A*. Uma variante da **LMA** é a **Leucemia Promielocítica Aguda (LPA)** que contem a t(15;17) em que o gene *PML* do cromossoma 15 se funde com o gene do recetor α do ácido retinóico, *RAR α* , no cromossoma 17. A **LPA** caracteriza-se pela ausência dos recetores celulares CD34, HLA-DR E CD11 negativos⁷.

No entanto, em alguns casos de **LMA**, pelo facto de terem uma mutação no gene *nucleophosmin (NPM1)*, gene envolvido na metilação do DNA), podem mimetizar uma **LPA**²⁷.

A **LMA** com o **gene NPM1 mutado**, tal como na **LPA**, também apresenta recetores celulares CD34, HLA-DR negativos, o que pode induzir em erro no diagnóstico do tipo de leucemia^{24;25}.

Desta forma, foi dado seguimento ao estudo da doente e foi feita a análise citogenética e molecular.

O diagnóstico da LPA requer a evidência de um transcrito *PML-RARA* ou citogeneticamente a translocação t(15; 17).

Pela análise da técnica de FISH (Anexo I Figura 15) temos a confirmação de que não se trata de uma LPA uma vez que não foi detetada a translocação t(15; 17).

Pela análise molecular, pela técnica de RT-PCR, confirma-se que a doente não tem uma **LPA**, mas sim uma **LMA com mutação no gene NPM1**.

Conclusão:

Na LMA como existe uma ineficácia no processo hematopoiético, em que ocorre uma acumulação de precursores mielóides, os blastos, que rapidamente se acumulam na medula óssea e sangue periférico. Os sintomas mais comuns são anemia que se pode manifestar pela fadiga, fraqueza; episódios hemorrágicos devido à trombocitopenia; febre e infeções causados pela neutropenia.

Neste caso clínico a doente apresentava trombocitopenia que acontece devido à infiltração da medula óssea pelos blastos (diminuindo a produção de plaquetas).

Nos doentes com LMA é frequente apresentarem o valor dos D-dímeros elevados, como é o caso da paciente em estudo (Anexo I Tabela 11), sendo que os mecanismos pelo qual isso acontece ainda não se encontram descritos²⁹.

Para tentar colmatar possíveis erros de diagnóstico têm-se vindo a desenvolver vários estudos para melhorar a classificação das leucemias por imunofenotipagem, nomeadamente a classificação de **LMA** com mutação no gene *NPM1*, que imunofenotipicamente, mimetiza

uma **LPA**. Desta forma os doentes por imunofenotipagem aparentam ter uma **LPA** quando na verdade têm uma **LMA** com **mutação no gene NPM1**.

Assim, existem vários estudos descritos na literatura que tentam encontrar marcadores antigénicos celulares mais específicos de cada uma das leucemias de modo que se consiga uma melhor distinção por imunofenotipagem^{25;26;27;28}.

Caso Clínico 2

1º dia de internamento:

Uma doente do sexo feminino com 71 anos dá entrada nas urgências do hospital CHUC com cefaleias, vômitos e dificuldade na locomoção. Não apresentava febre.

Foram realizados exames imagiológicos nos quais não se verificou hemorragias intracranianas, sem lesões vasculares; as vias de circulação do LCR encontravam-se alargadas sem alteração do volume cefálico.

Para orientar o diagnóstico foram realizadas análises clínicas que se encontram descritas no Anexo 2.

Pela análise dos parâmetros bioquímicos (Anexo 2, Tabela 12) verifica-se uma ligeira diminuição nos valores de sódio (hiponatremia) e cloro (hipoclorémia), o que pode ser devido ao facto de a utente ter perdido eletrólitos pelos vômitos. O valor da glicose encontra-se elevado, o que pode ser devido ao facto de a paciente ser diabética. A proteína C reativa é considerada uma proteína de fase aguda e encontra-se aumentada o que sugere que a doente poderá ter uma infeção.

Pela análise do hemograma (Anexo 2, Tabela 13) verifica-se a existência de leucocitose, ou seja, um aumento no número de leucócitos nomeadamente nos neutrófilos. Uma vez que o quadro clínico é suspeito de uma infeção foi feita a colheita de sangue para hemocultura.

As provas de coagulação não apresentam alterações significativas.

Após 3 dias de internamento:

A doente permaneceu internada sendo que o seu quadro clínico foi se agravando nos dias seguintes. A doente começou a ter febre que resiste aos antipiréticos, tonturas e os episódios de vômitos agravaram-se. Foi feita nova avaliação clínica: ecografia renal sem alterações, Raio-X torácico sem lesões, a doente não tinha tosse nem expetoração ou dispneia. Apresentava problemas neurológicos (tonturas e confusão mental) foi feita a colheita de LCR para investigar uma possível infeção do sistema nervoso central.

De forma a chegar um diagnóstico foi realizada nova análise bioquímica e como a doente começou a ter febre foi repetida nova colheita para hemocultura.

Pela análise dos resultados da bioquímica (Anexo 2, Tabela 12) verificou-se que a doente continuava com hiponatremia, hipoclorémia e uma hipocaliemia que se agravou devido à continuidade dos episódios de vômitos e conseqüentemente ocorreu uma diminuição na

osmolalidade. O valor da proteína C reativa aumentou em comparação com a primeira análise, significando que o quadro infeccioso se tinha agravado.

Por outro lado, a hemocultura testou positiva. Assim, foi feito o esfregaço para a coloração Gram e foi feita a repicagem para meio GS. Pela observação do esfregaço foi detetado bacilos de Gram positivo.

Além disso, realizou-se a análise bioquímica e citológica do LCR (Anexo 2, Tabela 14) para despistar o diagnóstico de infeções do SNC. Na análise bioquímica do LCR foi detetado um aumento no valor das proteínas o que pode ser devido ao metabolismo bacteriano, no entanto, o valor de glicose manteve-se dentro dos valores de referência, o que pode ser pelo facto de a doente ser diabética. Na análise citológica foi detetado a presença de leucócitos com predomínio de células mononucleares, mais um indício de que poderia ser uma infeção bacteriana.

Procedeu-se à inoculação do LCR nos meios GS e PVX para o isolamento do agente infeccioso e também o esfregaço para coloração de Gram. Após incubação foram observadas colónias pequenas, lisas e acinzentadas (Figura 14 e 15).



Figura 14: Crescimento bacteriano em cultura de GS (Hemocultura).



Figura 15: Crescimento bacteriano em cultura de GS (LCR).

Posteriormente realizou-se a identificação bacteriana cujo resultado foi *Listeria monocytogenes*. De seguida foi realizado o antibiograma manual em meio MH-F para a amostra de LCR e da hemocultura, de acordo com as regras recomendadas pelo EUCAST. Nas Figuras 16 e 17 estão apresentados os TSAs manuais realizados por repicagem da hemocultura e LCR, respetivamente.



Figura 16: Antibiograma manual para *Listeria monocytogenes* (Hemocultura).



Figura 17: Antibiograma manual para *Listeria monocytogenes* (LCR).

Pela análise dos resultados do antibiograma, tanto da repicagem da hemocultura como do LCR, concluiu-se que *Listeria monocytogenes* era sensível à penicilina, ampicilina, metropenemo, eritromicina e trimetropim/sulfametoxazol.

Primeiramente foi administrada a terapêutica empírica com vancomicina, no entanto, após identificação e realização do TSA a terapêutica foi alterada para ampicilina e trimetropim/sulfametoxazol.

Listeria monocytogenes é uma bactéria intracelular facultativa em que a contaminação ocorre essencialmente pela ingestão de alimentos contaminados. Esta bactéria causa gastroenterites e se ocorrer disseminação pode provocar infeções do SNC, por exemplo meningoencefalites como é o caso da doente em estudo.

9. Conclusão

O estágio realizado no SPC-CHUC permitiu-me estar em contacto com a realidade de um laboratório multidisciplinar de análises clínicas e isso deu-me a possibilidade de colocar em prática conhecimentos adquiridos nas diferentes áreas lecionadas bem como adquirir mais competências a nível da prática laboratorial.

Além disso, também me possibilitou o contacto com diversos profissionais de saúde que me esclareceram dúvidas e me ajudaram a compreender os diferentes processos da rotina laboratorial.

Em suma, a realização do estágio permitiu-me desenvolver capacidades de organização e de trabalho em equipa, mas acima de tudo adquirir experiência nas diferentes áreas laboratoriais o que será uma mais-valia para a minha integração no mercado de trabalho.

10. Bibliografia

1. BURTIS, CARL A.; BRUNS, David E. - **Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. 7th. Ed. Elsevier, 2015
2. TURGEON, Mary Louise - **Clinical Hematology: Theory and Procedures**. 5th. Ed. Philadelphia: Kluwe Wolters, 2010. ISBN 9781608310760.
3. GEORGE-GAY, Beverly; PARKER, Katherine - Understanding the complete blood count with differential. **Journal of Perianesthesia Nursing**. ISSN 10899472. 18:2 (2003) 96–117.
4. J. BAIN, Barbara - **Células Sanguíneas - Um Guia Prático**. 5^a. Ed. Artmed, 2016. ISBN 9788578110796.
5. WANG, Chia Yu; BABITT, Jodie L. - Hepcidin regulation in the anemia of inflammation. **Current Opinion in Hematology**. ISSN 15317048. 23:3 (2016) 189–197.
6. RAJ, Dominic S. C. - Role of Interleukin-6 in the Anemia of Chronic Disease. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**. ISSN 00490172. 38:5 (2009) 382–388.
7. HOFFBRAND, A. Victor; A.H.MOSS, Paul - **Hoffbrand's essencial haematology**. 7th. Ed. Wiley-Blackwell, 2016. ISBN 9781118408674.
8. PARENTE, Jason - Diagnostics for White Blood Cell Abnormalities: Leukocytosis and Leukopenia. **Physician Assistant Clinics**. ISSN 24057991. 4:3 (2019) 625–635.
9. RILEY, Lyrad K.; RUPERT, Jedda - Evaluation of Patients with Leukocytosis. **American family physician**. ISSN 15320650. 92:11 (2015) 1004–1011.
10. ARNETH, Borros M.; MENSCHIKOWKI, Mario - Technology and New Fluorescence Flow Cytometry Parameters in Hematological Analyzers. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**. ISSN 10982825. 29:3 (2015) 175–183.
11. CELLS, White Pathologicalprecursor - WPC Further classification of WBC abnormalities Focus on reactive conditions once malignant conditions have been excluded pathological and precursor.
12. CHABOT-RICHARDS, Devon S.; GEORGE, Tracy I. - White Blood Cell Counts. Reference Methodology. **Clinics in Laboratory Medicine**. ISSN 15579832. 35:1 (2015) 11–24.
13. KEOHANE, Elaine M.; OTTO, Catherine N.; WALENGA, Jeanine M. - **Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications**. 5th. Ed. Elsevier Saunders, 2016. ISBN

9780323239066.

14. SNOJ, N. - Determination of the erythrocyte sedimentation rate (ESR) on two automated systems using EDTA samples in patients with rheumatologic diseases.

15. BERNADETTE F. RODAK, Jacqueline H. Carr - **Clinical Hematology Atlas**. 5th. Ed. Elsevier, 2016. ISBN 2013206534.

16. PIERRE, Robert V. - Red cell morphology and the peripheral blood film. **Clinics in Laboratory Medicine**. ISSN 02722712. 22:1 (2002) 25–61.

17. TYRRELL, Laura *et al.* - Morphologic changes in red blood cells: An illustrated review of clinically important light microscopic findings. **Malaysian Journal of Pathology**. ISSN 01268635. 43:2 (2021) 219–239.

18. WAHED, Amer; DASGUPTA, Amitava - Benign White Blood Cell and Platelet Disorders. **Hematology and Coagulation**. (2015) 81–92.

19. MILOS, M. *et al.* - Evaluation and performance characteristics of the coagulation system: ACL TOP analyzer - HemosIL reagents. **International Journal of Laboratory Hematology**. ISSN 17515521. 31:1 (2009) 26–35.

20. FAVALORO, Emmanuel J.; LIPPI, Giuseppe - **Hemostasis and thrombosis: Methods and Protocols**. ISBN 9781493971947.

21. WINTER, William E.; FLAX, Sherri D.; HARRIS, Neil S. - Coagulation testing in the core laboratory. **Lab Medicine**. ISSN 19437730. 48:4 (2017) 295–313.

22. CRAWFORD, Fay *et al.* - D-dimer test for excluding the diagnosis of pulmonary embolism. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. ISSN 1469493X. 2016:8 (2016).

23. TILLE, Patricia M. - **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology**. 14th. Ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2017. ISBN 9772081415.

24. EUGENE W. NESTER, DENISE G. ANDERSON, C. EVANS ROBERTS, JR., Martha T. Nester - **Microbiology: A Human Perspective**. 7th. Ed. New York. ISBN 9780073375311.

25. MURRAY, Patrick R. - **Medical Microbiology**. 8th. Ed. Philadelphia: Elsevier Inc., 2016. ISBN 9780323299565.

26. CINQUANTA, Luigi; FONTANA, Desré Ethel; BIZZARO, Nicola - Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? **Autoimmunity Highlights**. 8:1 (2017).

27. ARANA ROSAINZ, Manuel J. *et al.* - Acute myeloid leukemia with mutated NPM1 mimics

acute promyelocytic leukemia presentation. **International Journal of Laboratory Hematology**. ISSN 1751553X. 43:2 (2021) 218–226.

28. FERRARI, Angela *et al.* - Immunophenotype distinction between acute promyelocytic leukaemia and CD15- CD34- HLA-DR- acute myeloid leukaemia with nucleophosmin mutations. **Hematological Oncology**. ISSN 02780232. 30:3 (2012) 109–114.

29. SCHUTTE, T.; THIJS, A.; SMULDERS, Y. M. - Never ignore extremely elevated D-dimer levels: They are specific for serious illness. **Netherlands Journal of Medicine**. ISSN 03002977. 74:10 (2016) 443–448.

30. MASON, Emily F. *et al.* - A distinct immunophenotype identifies a subset of NPM1-mutated AML with TET2 or IDH1/2 mutations and improved outcome. **American Journal of Hematology**. ISSN 10968652. 93:4 (2018) 504–510.

31. GUPTA, Monali *et al.* - Radar plots facilitate differential diagnosis of acute promyelocytic leukemia and NPM1+ acute myeloid leukemia by flow cytometry. **Cytometry Part B - Clinical Cytometry**. ISSN 15524957. 100:4 (2021) 409–420.

32. SPINO, Javier Díez - Diagnosis and management of type 2 diabetes. **Atencion Primaria**. ISSN 15781275. 42:SUPPL. 1 (2010) 2–8.

Anexos

Anexo I

Tabela 8: Resultados dos parâmetros da análise Bioquímica.

Parâmetros	Resultados	Valores de Referência
Glicose	145 mg/dL	60 – 109 mg/dL
Azoto ureico	10 mg/dL	7,9 – 20,9 mg/dL
Creatinina	0,64 mg/dL	0,55 – 1,02 mg/dL
Uratos (Ácido Úrico)	3,9mg/dL	-----
Sódio	138 mmol/L	136 – 146 mmol/L
Potássio	2,9 mmol/L	3,5 – 5,1 mmol/L
Cloro	101 mmol/L	101 – 109 mmol/L
Cálcio	8,7 mg/dL	8,8 – 10,6 mg/dL
Osmolalidade	277 mOSM/Kg	260 – 302 mOSM/Kg
Desidrogenase láctica	225 U/L	< 247 U/L
AST	12 U/L	< 31 U/L
ALT	16 U/L	< 34 U/L
Fosfatase alcalina	85 U/L	30 – 120 U/L
Gama GT	27 U/L	< 38 U/L
Bilirrubina Total	0,5 mg/dL	0,2 – 1,2 mg/dL
Creatina cinase	26 U/L	< 145 U/L
Peptídeo Natriurético B	42,1 ng/L	<16 ng/L
Proteína C reativa	5,96 mg/dL	< 0,50 ng/L

Tabela 9: Critérios para o diagnóstico da Diabetes. Adaptado de ³².

Diagnóstico Diabetes	
Glicémia Plasmática em Jejum	≥ 126mg/dL
Glicémia ao acaso	≥ 200mg/dL
Hemoglobina Glicada (HbA1C)	≥ 6,5%

Tabela 10: Resultados laboratoriais obtidos no hemograma.

Parâmetros	Resultados	Valores de referência
Leucócitos	73,3 x10 ⁹ /L	3,60 – 10,5 x10 ⁹ /L
Eritrócitos	2,15 x10 ¹² /L	3,85 – 5,2 x10 ¹² /L
Hemoglobina	7,6 g/dL	11,8 – 15,8 g/dL
Hematocrito	21,7%	35 – 45,5 %
Volume corpuscular médio	100,9 fL	80 – 101 fL
Hemoglobina Corpuscular média	35,3pg	27 – 34 pg
C. Hemoglobina corpuscular média	35,0 g/dL	31 – 37 g/dL
Coefficiente variação eritrócitos	13,1	11,5 – 15,0
Plaquetas	36 x10 ⁹ /L	140 – 385 x10 ⁹ /L
Volume plaquetar médio	10,9 fL	8,5 – 12,0 fL
Plaquetocrito	0,04 %	0,20 – 0,45%
Coefficiente de Variação Plaquetas	16,7	9,0 – 17,0

Tabela 11: Resultados laboratoriais obtidos no leucograma.

Parâmetro	Resultados	Valores de referência
Blastos	13,7 x10 ⁹ /L	3,60 – 10,5 x10 ⁹ /L
Mielócitos	12,18 x10 ⁹ /L	1,50 – 7,70 x10 ⁹ /L
Neutrófilos	1,03 x10 ⁹ /L	1,10 – 4,40 x10 ⁹ /L
Linfócitos	0,51 x10 ⁹ /L	0,10 – 0,90 x10 ⁹ /L
Monócitos	0,00 x10 ⁹ /L	0,02 – 0,50 x10 ⁹ /L
Eosinófilos	0,01 x10 ⁹ /L	0,00 – 0,20 x10 ⁹ /L
Basófilos	3,86 x10 ¹² /L	3,85 – 5,2 x10 ¹² /L

Tabela 12: Resultados laboratoriais obtidos para o estudo da hemostase.

Parâmetro	Resultados	Valores de referência
Tempo de Protrombina (TP)	12,2 seg	9,4 – 12,5 seg
Controlo	11,6 seg	
Protrombinémia	92%	70 – 120%
Relação Normalizada (INR)	1,05	
Tempo de Trombolastina Parcial Ativado	24,0 seg	23,4 – 35,4seg
Controlo	28,8 seg	
Ratio	0,83	0,81 – 1,19
Fibrinogénio	435,0 mg/dL	200 – 500 mg/dL
D-Dímeros	17496 ng/mL	<500

Citometria de Fluxo

Imunofenotipagem

Produto:	Sangue periférico
Celularidade	O estudo fenotípico revelou a presença de 3% de neutrófilos, 1% de monócitos, 1% de eritroblastos, 6% de linfócitos e 88% de blastos/Promielócitos (CD117+/CD34+/-).
Células T	Representavam 6% de todas as células, das quais 45% eram CD4, 41% eram CD8 e 13% gama/delta.
Células B	Representavam 0.6% de todas as células, com fenótipo normal e sem clonalidade para as cadeias leves das imunoglobulinas.
Células NK	Representavam 0.5% de todas as células.
Blastos	Positivos: CD117, MPO, CD45 débil, CD33+, CD71, CD123. Negativos: CD34, HLA-DR, CD13 débil/neg, CD10, CD11b, CD19, CD3, CD79a, CD7, CD56, CD35, CD64, CD14, IREM, CD36, Tdt, CD22, CD203, CD203c, CD42a, CD61, CD7.1, CD15.
Comentário:	O estudo fenotípico do Sangue periférico detectou 88% de células com fenótipo de Promielócitos.

Figura 18: Resultados obtidos pela técnica de citometria de fluxo.

Citogenética

FISH

Produto (FISH)	Sangue Periférico (blastos)
LSI KMT2A (MLL) (rearranjo 11q23) Comentário:	Não se detectou rearranjo Da análise dos núcleos com a sonda LSI MLL Dual Color, Break Apart Rearrangement (Abbott) não se detectaram rearranjos da região 11q23 - gene KMT2A (previamente designado MLL).
LSI t(15;17) PML/RARA Comentário:	Não se detectou translocação Da análise dos núcleos com a sonda LSI t(15;17) PML/RARA Dual Color Dual Fusion (Abbott) <u>não se detectou a translocação t(15;17)(q24;q21) PML-RARA.</u>
Relatório (FISH)	Após hibridização in situ nos blastos separados não se detectaram rearranjos KMT2A nem t(15;17).

Figura 19: Resultados obtidos pela técnica de FISH.

Anexo 2:

Tabela 13: Resultados dos parâmetros obtidos da análise bioquímica.

	Resultados	Resultados (passado 3 dias)	Valores de Referência
Glicose	168 mg/dL	171 mg/dL	60-109 mg/dL
Azoto ureico	24,2 mg/dL	16,4 mg/dL	7,9-20,9 mg/dL
Creatinina	1,00 mg/dL	0,78 mg/dL	0,55 – 1,02 mg/dL
Sódio	130 mmol/L	119 mmol/L	136 – 146 mmol/L
Potássio	4,1 mmol/L	2,6 mmol/L	3,5 – 5,1 mmol/L
Cloro	94 mmol/L	76 mmol/L	101 – 109 mmol/L
Cálcio	9,0 mg/dL	7,1 mg/dL	8,8 – 10,6 mg/dL
Osmolalidade	269 mOSM/Kg	246 mOSM/Kg	260 – 302 mOSM/Kg
Desidrogenase láctica	221 U/L	168 U/L	< 247 U/L
AST	17 U/L	13 U/L	< 31 U/L
ALT	12 U/L	11 U/L	< 34 U/L
Fosfatase alcalina	79 U/L	63 U/L	30 – 120 U/L
Gama GT	12 U/L	13 U/L	< 38 U/L
Bilirrubina Total	1,5 mg/dL	0,4 mg/dL	0,2 – 1,2 mg/dL
Bilirrubina Direta	0,6 U/mg/dL	44 mg/dL	< 0,5 mg/dL
Alfa amilase	42 U/L	-	25 – 125 U/L
Lipase	13 U/L	-	< 67 U/L
Creatina cinase	94 U/L	44 U/L	< 145 U/L
Troponina I	13,2 ng/L	-	<16 ng/L
Proteína C reativa	12,20 mg/dL	26,53 mg/dL	< 0,50 ng/L

Tabela 14: Resultados laboratoriais obtidos no hemograma e leucograma.

Parâmetros	Resultados	Valores de referência
Leucócitos	13,7 x10⁹/L	3,60-10,5 x10 ⁹ /L
Neutrófilos	12,18 x10⁹/L	1,50- 7,70 x10 ⁹ /L
Linfócitos	1,03 x10 ⁹ /L	1,10-4,40 x10 ⁹ /L
Monócitos	0,51 x10 ⁹ /L	0,10-0,90 x10 ⁹ /L
Eosinófilos	0,00 x10 ⁹ /L	0,02-0,50 x10 ⁹ /L
Basófilos	0,01 x10 ⁹ /L	0,00-0,20 x10 ⁹ /L
Eritrócitos	3,86 x10¹²/L	3,85-5,2 x10¹²/L
Hemoglobina	11,8 g/dL	11,8-15,8 g/dL
Hematócrito	34,1%	35-45,5 %
Volume corpuscular médio	88,3 fL	80-101 fL
Hemoglobina Corpuscular média	30,6 pg	27-34 pg
C. Hemoglobina corpuscular média	34,6 g/dL	31-37 g/dL
Coefficiente variação eritrócitos	13,1	11,5-15,0
Plaquetas	285 x10⁹/L	140-385 x10⁹/L
Volume plaquetar médio	11,0 fL	8,5-12,0 fL
Plaquetocrito	0,31 %	0,20-0,45%
Coefficiente de Variação Plaquetas	12,7	9,0-17,0

Tabela 15: Análise bioquímica e citológica do LCR.

Parâmetros	Resultados	Valores de referência
Proteínas (LCR)	634 mg/dL	15-40 mg/dL
Glicose (LCR)	67 mg/dL	40-70 mg/dL
Cloro (LCR)	100 mmol/L	116-122 mg/dL
Leucócitos	328 /mm³	<3 mm ³
Eritrócitos	40 /mm³	<3 mm ³
Predomínio	Mononucleares (79%)	