



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Beatriz Ribeiro Sebastião

## Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

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

Setembro de 2019



1 2 9 0



UNIVERSIDADE DE  
**COIMBRA**

Beatriz Ribeiro Sebastião

# **RELATÓRIO DE ESTÁGIO**

## **MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS**

Relatório de estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo  
Doutor Frederico Fernando Monteiro Marques  
Universidade de Coimbra

Setembro de 2019



***“The journey of a thousand miles must begin  
with a single step.”***

**Lao Tzu**



# Agradecimentos

Aos meus pais, que me proporcionaram a oportunidade de enveredar por este Mestrado.

A toda a equipa de profissionais com quem contactei durante a minha estadia no IPO de Coimbra, em especial ao Dr. Frederico Valido, diretor do Serviço de Patologia Clínica e orientador externo de estágio, pela oportunidade e pelo acompanhamento. Um especial agradecimento também aos orientadores dos vários setores por onde passei, com destaque para a Dra. Maria Alexandre e Dr. Jorge Reis, pela disponibilidade e por todo o conhecimento transmitido.

À Professora Doutora Maria do Céu, coordenadora precedente do Mestrado, pelo acompanhamento e disponibilidade ao esclarecimento de todas as dúvidas.

À Professora Doutora Sara Domingues, orientadora interna, pela sua paciência, ajuda e por todos os esclarecimentos e disponibilidade.

Às minhas colegas de estágio pela ótima companhia e também pela sua ajuda, e a todos os amigos que me acompanharam e tornaram este percurso mais fácil.



# Índice

INTRODUÇÃO .....	I
I. CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO .....	I
II. SERVIÇO DE PATOLOGIA CLÍNICA.....	2
2.1 CONTROLO DE QUALIDADE .....	3
2.2 SETOR DE BIOQUÍMICA.....	4
2.3 SETOR DE IMUNOLOGIA E ENDOCRINOLOGIA .....	5
2.4 SETOR DE MICROBIOLOGIA.....	7
2.4.1 <i>Microbiologia</i> .....	8
2.4.2 <i>Produtos Biológicos</i> .....	9
2.4.2.1 Urina.....	10
a) Processamento .....	10
b) Interpretação de resultados .....	12
2.4.2.2 Fezes.....	15
a) Processamento .....	16
b) Interpretação de resultados .....	18
2.4.2.3 Sangue.....	19
a) Processamento .....	20
b) Interpretação de resultados .....	22
2.4.2.4 Secreções do aparelho respiratório .....	22
<b><i>Aparelho respiratório superior</i></b> .....	22
<b><i>Aparelho respiratório inferior</i></b> .....	23
a) Processamento.....	23
b) Interpretação de resultados .....	24
2.4.2.5 Exsudados vaginais .....	26
a) Processamento .....	27
b) Interpretação de resultados .....	28
2.4.2.6 Exsudados purulentos.....	29
a) Processamento .....	30
b) Interpretação de resultados .....	31
2.4.2.7 Ponta de cateter.....	32
a) Processamento .....	32
b) Interpretação de resultados .....	33

2.4.3 Identificação de microrganismos e Teste de suscetibilidade a antibióticos .....	34
2.4.4 <i>Biologia Molecular</i> .....	37
<b>2.5 SETOR DE HEMATOLOGIA</b> .....	<b>38</b>
2.5.1 <i>Hematologia</i> .....	38
2.5.2 <i>Produtos biológicos</i> .....	40
2.5.3 <i>Hemograma</i> .....	41
2.5.3.1 <i>Metodologia</i> .....	41
2.5.3.2 <i>Parâmetros determinados e esfregaço de sangue periférico</i> .....	43
2.5.3.3 <i>Alterações patológicas das várias linhas celulares</i> .....	46
2.5.4 <i>Velocidade de sedimentação</i> .....	56
2.5.4.1 <i>Metodologia</i> .....	57
2.5.4.2 <i>Alterações associadas a patologias</i> .....	57
2.5.5 <i>Testes de coagulação sanguínea</i> .....	57
2.5.5.1 <i>Metodologia</i> .....	57
2.5.5.2 <i>Parâmetros determinados e alterações patológicas associadas</i> .....	58
2.5.6 <i>Imunofenotipagem</i> .....	61
2.5.6.1 <i>Metodologia e parâmetros determinados</i> .....	61
2.5.6.2 <i>Alterações associadas a patologias</i> .....	62
2.5.7 <i>Biologia Molecular</i> .....	63
<b>2.6 CASO CLÍNICO</b> .....	<b>64</b>
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>71</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>83</b>

# Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Gráfico de um proteinograma normal.....	7
<b>Figura 2</b> - <b>A</b> , morfologia da coloração de Gram bacteriana. <b>B</b> , morfologias bacterianas.....	8
<b>Figura 3</b> - Esquema usado no Setor de Microbiologia do IPO de Coimbra como guia no processo de identificação.....	14
<b>Figura 4</b> - Imagem microscópica de uma suspensão obtida para a realização do teste do tubo germinativo. Pode observar-se crescimento de tubos germinativos (assinalados a vermelho). .....	15
<b>Figura 5</b> - Agentes patogénicos comuns e microbiota comensal do trato gastrointestinal. Fonte: (Abdelraouf A. Elmanama, 2007).....	16
<b>Figura 6</b> - Observação microscópica de “clue-cells” associada a um caso de infeção vaginal por <i>Gardnerella vaginalis</i> . .....	28
<b>Figura 7</b> - Placa de meio PVX semeado a partir de uma amostra de exsudado purulento superficial, com evidência de crescimento de <i>Proteus</i> spp. Pode observar-se a presença de um padrão de crescimento característico desta espécie denominado de swarming. ....	31
<b>Figura 8</b> - Esquema representativo do processo de hematopoiese.....	39
<b>Figura 9</b> - Representação do modelo clássico da coagulação sanguínea.....	40
<b>Figura 10</b> - Imagem microscópica da observação de um esfregaço de sangue periférico corado com azul de metileno. Os reticulócitos presentes apresentam granulações azuis no seu interior.....	44
<b>Figura 11</b> - Imagem representativa da técnica de esfregaço de sangue periférico.....	45
<b>Figura 12</b> - Algumas das mais frequentes alterações eritrocitárias em tamanho (anisocitose) e forma (poiquilocitose) e respetivas causas. DIC, coagulopatia intravascular disseminada; G6PD, glucose-6-fosfato desidrogenase; HUS, síndrome hemolítica-urémica; TTP, púrpura trombocitopénica trombótica.....	46
<b>Figura 13</b> - Caso de anemia hemolítica autoimune associada a LLC. O esfregaço de sangue periférico revela a presença de linfócitos característicos (pequenos, com pouco citoplasma e cromatina de aspeto grumoso) e de sombras nucleares. ....	52
<b>Figura 14</b> - Esfregaço de sangue periférico correspondente a um caso de LMC. Pode observar-se uma proliferação de células de linhagem mielóide, nomeadamente, monócitos, neutrófilos e eosinófilos. Pode também ser observado um basófilo. ....	53

<b>Figura 15</b> - Esfregaço de sangue periférico correspondente a um caso de mielofibrose primária. Pode observar-se um eritroblasto e a presença de poiquilocitose eritrocitária, com especial destaque para os dacriócitos.....	53
<b>Figura 16</b> - Esfregaço de sangue periférico de um caso de linfoma linfoplasmocítico com linfocitose caracterizada pela presença de linfócitos tipicamente pequenos e de morfologia anormal.....	55
<b>Figura 17</b> - Fórmula utilizada para a determinação da Relação Normalizada Internacional.	58
<b>Figura 18</b> - Representação esquemática da translocação que origina o cromossoma de Philadelphia. O gene <i>abl</i> encontra-se no braço longo do cromossoma 9; o gene <i>bcr</i> está localizado no braço longo do cromossoma 22.....	63

# Índice de Tabelas

<b>Tabela i</b> - Principais equipamentos do Setor de Bioquímica e respetivos métodos de análise. .....	5
<b>Tabela ii</b> - Principais equipamentos do Setor de Imunologia/Endocrinologia e respetivos métodos de análise.....	6
<b>Tabela iii</b> - Principais equipamentos do Setor de Microbiologia e respetivas funções/testes desempenhados.....	8
<b>Tabela iv</b> - Critérios de Murray & Washington. ....	24
<b>Tabela v</b> - Interpretação de esfregaços, corados pela técnica de Kinyoun, para a pesquisa de BAAR.....	25
<b>Tabela vi</b> - Os agentes etiológicos mais frequentemente associados a infeções do trato genital. ....	27
<b>Tabela vii</b> - Associação entre as cartas de identificação utilizadas pelo sistema Vitek®2, os grupos de microrganismos que permitem identificar e as densidades, em escala McFarland, das suspensões associadas. ....	35
<b>Tabela viii</b> - Cartas de TSA utilizadas no Setor de Microbiologia e sua associação aos grupos de microrganismos a que se destinam. ....	35
<b>Tabela ix</b> - Principais equipamentos do Setor de Hematologia e respetivas funcionalidades. .....	38
<b>Tabela x</b> - Parâmetros determinados pelo leucograma.....	43
<b>Tabela xi</b> - Parâmetros determinados pelo eritrograma.....	44
<b>Tabela xii</b> - Parâmetros determinados pelo plaquetograma. ....	45
<b>Tabela xiii</b> - Classificação das anemias.....	47
<b>Tabela xiv</b> - Parâmetros de maior relevância, determinados aquando da chegada do doente ao IPO de Coimbra.....	65
<b>Tabela xv</b> - Parâmetros de maior relevância, determinados após a realização de 3 ciclos de quimioterapia.....	66
<b>Tabela xvi</b> - Parâmetros de maior relevância, determinados após o doente ter recorrido a consulta com queixas de febre e expetoração. ....	66
<b>Tabela xvii</b> - Parâmetros de maior relevância, determinados a 17/05/2019.....	67
<b>Tabela xviii</b> - Apresentação de todos os meios de crescimento utilizados no Setor de Microbiologia do IPO de Coimbra e respetiva classificação e composição. ....	85

<b>Tabela xix</b> - Valores de referência associados aos vários parâmetros determinados pelo leucograma.....	89
<b>Tabela xx</b> - Valores de referência associados aos vários parâmetros determinados pelo eritrograma.....	89
<b>Tabela xxi</b> - Valores de referência associados aos vários parâmetros determinados pelo plaquetograma.....	89
<b>Tabela xxii</b> - Valores de referência associados aos testes de avaliação da coagulação sanguínea.....	90
<b>Tabela xxiii</b> - Valor de referência associado à velocidade de sedimentação eritrocitária....	90

# Abreviaturas

ACTH – hormona adrenocorticotrófica, *do inglês adrenocorticotropic hormone*

ADC – anemia da doença crónica

ALT – alanina aminotransferase

BASO – basófilos

BHI – (caldo) cérebro-coração, *do inglês brain heart infusion*

CAM – (gelose) Campyloset

CAT – teste para deteção de atividade de carbapenemases, *do inglês Carbapenemase activity test*

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

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

COS – (gelose) Columbia

CRAB – hipercalcémia, insuficiência renal, anemia e lesões osteolíticas

E.P.E. – entidade pública empresarial

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

EOS – eosinófilos

ESBL –  $\beta$ -lactamases de espectro alargado, *do inglês extended spectrum  $\beta$ -lactamase*

FA – fosfatase alcalina

FvW – fator von Willebrand

GDH – glutamato desidrogenase

G-GT – gama-glutamiltransferase

GN – (caldo para) Gram negativos

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogénio

H<sub>2</sub>S – sulfato de hidrogénio

HbA<sub>1c</sub> – Hemoglobina glicada

HCl – ácido clorídrico

HEK – (meio) Hektoen

HLR – reticulócitos de elevada dispersão luminosa, *do inglês high light scatter reticulocytes*

Hto – hematócrito

ICS – infeção da corrente sanguínea

IPO – Instituto Português de Oncologia

IPOCFG – Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil

IRF – fração de reticulócitos imaturos, *do inglês immature reticulocyte fraction*

ISI – índice de sensibilidade internacional

ITU – infecção do trato urinário

KCS – (caldo) Schaedler com vitamina k3

LCR – líquido cefalorraquidiano

LDGCB – linfoma difuso de grandes células B

LDH – lactato desidrogenase

LLC – leucemia linfocítica crónica

LMC – leucemia mielóide crónica

LMMC – leucemia mielomonocítica crónica

LNH – linfoma não Hodgkin

LYM – linfócitos

MCH – hemoglobina corpuscular média, *do inglês mean corpuscular hemoglobin*

MCHC – concentração de hemoglobina corpuscular média, *do inglês mean corpuscular hemoglobin concentration*

MCV – volume médio eritrocitário, *do inglês mean corpuscular volume*

MH – (gelose) Mueller-Hinton

MH-F – (gelose) Mueller-Hinton para fastidiosos

MONO – monócitos

MPV – volume plaquetar médio, *do inglês mean platelet volume*

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *do inglês methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

MRV – volume reticulocitário médio, *do inglês mean reticulocyte volume*

MSCV – volume médio de células esféricas de linha vermelha, *do inglês mean spheroid cell volume*

NAD – dinucleótido de nicotinamida adenina

NEU – neutrófilos

NK – células assassinas naturais, *do inglês natural killer cells*

PACS – Sistema de Comunicação e Arquivagem de Imagens, *do inglês Picture Archiving and Communication System*

PBPs – proteínas de ligação à penicilina, *do inglês penicillin-binding proteins*

pCO<sub>2</sub> – pressão de dióxido de carbono

PCR – reação de polimerase em cadeia, *do inglês polymerase chain reaction*

PCT – plaquetócrito

PDW – amplitude de distribuição plaquetária, *do inglês platelet distribution width*

Ph – (cromossoma de) Philadelphia

PLT – plaquetas

pO<sub>2</sub> – pressão de oxigénio

POC – Point-of-care

PTH – hormona paratiroideia, *do inglês parathyroid hormone*

PVX – (gelose) PolyViteX

RBC – eritrócitos, *do inglês red blood cells*

RDW – amplitude de distribuição eritrocitária, *do inglês red cell distribution width*

RET – reticulócitos

RIA – radioimunoensaio

RNI – relação normatizada internacional

SCS – (agar) Schaedler

SGC2 – (gelose) Sabouraud com cloranfenicol e gentamicina

SMD – síndrome mielodisplásica

SMD-t – síndrome mielodisplásica associada à terapia

TDT – Técnico de diagnóstico e terapêutica

TP – tempo de protrombina

TSS – Técnico superior de saúde

TT – tempo de trombina

TTPA – tempo de tromboplastina parcial ativada

UFC – unidades formadoras de colónias

VCS – volume, condutividade, dispersão luminosa, *do inglês volume, conductivity, light scatter*

VS – velocidade de sedimentação

WBC – leucócitos, *do inglês white blood cells*

XLD – (meio) xilose-lisina-desoxicolato



## Resumo

O presente relatório é referente ao estágio realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas. Este estágio teve o seu início em dezembro de 2018 e o seu término em maio de 2019 e foi desenvolvido no IPO de Coimbra. Este relatório consiste num relato das atividades desenvolvidas nos vários setores do Laboratório de Patologia Clínica, da sua associação aos conhecimentos adquiridos e da sua importância no contexto de um hospital oncológico. Dois setores foram alvo de maior aprofundamento, com uma exposição mais detalhada dos parâmetros determinados e da sua interpretação, dos produtos biológicos tratados e com uma breve descrição do processo de colheita e da sua importância na perspetiva de um Técnico Superior de Saúde (TSS). Foram também elaboradas breves partes teóricas com o objetivo de melhor contextualizar o trabalho desenvolvido.

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

## Abstract

The present report refers to the internship carried out in the context of the Master's degree in Clinical Analysis. This internship had its beginning in December of 2018 and its end in May of 2019 and it took place at the IPO of Coimbra. This report is a description of the activities developed at the several departments of the Clinical Pathology Laboratory, of its association to acquired knowledge and of its importance in the context of an oncologic hospital. Two of the departments were the main target of focus, with a more detailed exposition of the assessed parameters as well as their interpretation, of the managed biological products and with a succinct description of the sample collection process and its importance through the perspective of a Senior Health Technician. Brief theoretical sections were also included with the purpose of better contextualize the developed work.

**Keywords:** Clinical Analysis, Microbiology, Hematology, Diagnosis, Oncology.



# Introdução

O presente estágio curricular foi desenvolvido no IPO de Coimbra e teve como objetivo a consolidação e o desenvolvimento dos conhecimentos adquiridos no decorrer do Mestrado em Análises Clínicas, assim como a sua associação a um ambiente profissional.

À semelhança do que se verifica no resto da Europa, Portugal tem demonstrado, nos últimos anos, um aumento regular na incidência da doença oncológica, a uma taxa constante de aproximadamente 3% ao ano. (Nogueira, 2018) O diagnóstico precoce é uma das importantes estratégias no combate à doença oncológica. (Nogueira, 2018) As análises clínicas são um importante meio auxiliar no diagnóstico e monitorização de doentes oncológicos, como evidenciado pelo presente relatório de estágio, que foi especialmente desenvolvido em torno dos setores de Hematologia e Microbiologia do Laboratório de Patologia Clínica do IPO de Coimbra. Serão descritas e desenvolvidas as análises realizadas aquando do decorrer do estágio em questão, assim como as suas associações patológicas e, em especial, a sua importância no contexto da doença oncológica. É também descrito o funcionamento do controlo de qualidade, de forma geral, relativamente aos vários setores do Laboratório. Adicionalmente, é ainda apresentado um caso clínico com o objetivo de interligar as análises efetuadas nos vários setores. Este caso, relativo a uma patologia hemato-oncológica, apresenta especial destaque para o envolvimento da microbiologia nos casos de doenças oncológicas no seu geral.

## I. Caracterização do local de estágio

O Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (IPOCFG) é uma unidade hospitalar integrada na rede de prestação de cuidados de saúde do Serviço Nacional de Saúde, especializada no diagnóstico e tratamento da doença oncológica. A sua população alvo corresponde aos habitantes da Região Centro do país, estimada em dois milhões de pessoas. Esta instituição encontra-se no topo da cadeia de referência hospitalar em oncologia.

Ao longo dos anos, o IPO de Coimbra tem vindo a crescer, com a modernização dos seus equipamentos e espaços, um processo que ganhou especial visibilidade nos últimos anos com a expansão do campus hospitalar, crescimento da capacidade instalada e melhoria das condições de bem-estar e conforto. São exemplos disto: o início dos tratamentos de

radiocirurgia, pelo Serviço de Radioterapia em 1996, que tornou o IPO de Coimbra um dos dois únicos centros do país a disponibilizar esta técnica, a criação do Serviço de Medicina Nuclear; entre muitas outras melhorias. Os vários serviços prestadores de cuidados do IPO de Coimbra estão divididos pelos diversos departamentos: Departamento de Radioterapia, Imagiologia e Medicina Nuclear; Departamento Laboratorial; Departamento de Especialidades Cirúrgicas e Departamento de Especialidades Médicas. O Departamento Laboratorial abrange o Laboratório de Anatomia Patológica, o Laboratório de Patologia Clínica e o Laboratório de Patologia Molecular. Foi no Laboratório de Patologia Clínica que o presente estágio decorreu.

## **II. Serviço de Patologia Clínica**

A equipa de profissionais pertencente ao Serviço de Patologia Clínica, cujo diretor é o Dr. Frederico Fernandes Monteiro Marques Valido, é constituída por: Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica (TDT), Técnicos Superiores de Saúde (TSS), Internos de especialidade, médicos especialistas, pessoal auxiliar e pessoal administrativo. O Serviço está dividido em quatro setores, nomeadamente: Hematologia, Microbiologia, Bioquímica e Imunologia/Endocrinologia.

O processo de análise das amostras inicia-se com a sua colheita. É muito importante que este primeiro passo seja corretamente efetuado de modo a fornecer amostras de boa qualidade, em quantidade suficiente, colhidas de maneira adequada e acompanhadas por informação clínica pertinente. As amostras são depois distribuídas pelos setores a que se destinam, sempre acompanhadas da respetiva requisição. Antes de se dar início ao seu processamento, todas as amostras são registadas no sistema. Após obtidos os resultados, segue-se o passo que conclui o processamento das amostras no setor: a validação. Nesta etapa é feita uma avaliação crítica dos resultados obtidos, tendo em conta o histórico do doente. Resultados que constituam valores muito afastados dos de referência ou que estejam em discordância com o historial clínico do doente devem ser repetidos para confirmação. A validação dos resultados deve ser feita em paralelo com a observação da respetiva requisição, onde podem vir discriminadas informações fornecidas pelo médico e necessárias à validação.

## 2.1 Controlo de qualidade

O laboratório clínico é definido como um serviço destinado à análise de amostras de doentes com o intuito de oferecer apoio ao diagnóstico e à terapêutica. É, portanto, de extrema importância a existência de controlos de qualidade que permitam garantir a segurança e a credibilidade do laboratório, pela obtenção de resultados fidedignos, de modo a garantir aos doentes a eficácia e qualidade das análises laboratoriais efetuadas. A garantia da qualidade num laboratório de análises clínicas é uma preocupação que abrange todas as etapas envolvidas no processo analítico, nomeadamente, as fases pré-analítica, analítica e pós-analítica. A fase pré-analítica abrange a solicitação da análise, a obtenção da amostra e a iniciação da análise em si; a fase analítica compreende o conjunto de operações necessário à realização das diferentes análises, de acordo com determinada técnica e, por fim, a fase pós-analítica tem início com a obtenção dos resultados e termina com a emissão do relatório final. (Santos e Junior, 2015)

O controlo de qualidade é classificado em controlo externo e controlo interno. O **controlo externo** avalia a exatidão dos resultados, permite avaliá-los objetivamente através de meios externos, por meio de uma avaliação estatística, e implica uma comparação interlaboratorial regular. Por sua vez, o **controlo interno** é intralaboratorial e caracteriza-se pela análise diária de amostras-controlo com o objetivo de avaliar a precisão dos resultados obtidos relativamente às amostras dos doentes, permitindo assim avaliar a eficiência e confiabilidade dos procedimentos realizados. A avaliação da exatidão e precisão dos resultados laboratoriais é importante na medida em que permite a deteção de erros. A exatidão relaciona-se com a existência de erros sistemáticos, que podem ser reduzidos pela utilização de métodos otimizados associados a calibradores. Por outro lado, a precisão alerta para a presença de erros aleatórios, que podem ser minimizados pela otimização das atividades operacionais ou instrumentais. (Santos e Junior, 2015) (Basques, 2009)

Nos vários setores do laboratório de patologia clínica do IPO de Coimbra são analisados diariamente três níveis de controlos internos (baixo, normal e alto), com a exceção do setor de microbiologia. Estes controlos são analisados em todos os equipamentos e os resultados obtidos devem se aproximar o mais possível, dentro de um dado intervalo de referência, dos valores reais conhecidos. Caso isto não se verifique, deve ser feita uma avaliação da situação de modo a decidir qual a melhor linha de ação, sendo que as hipóteses incluem: proceder a uma calibração do equipamento; a uma lavagem do mesmo ou utilizar novos controlos para realização de nova análise. Os resultados dos controlos são

avaliados segundo gráficos de Levey-Jennings, interpretados segundo as regras de Westgard, que permitem avaliar a relevância do desvio padrão associado a cada resultado. Relativamente ao setor de microbiologia, o controlo de qualidade interno é efetuado pela determinação e monitorização diária das temperaturas dos frigoríficos e estufas; pela utilização de placas de contacto, que permitem avaliar a esterilidade das superfícies do laboratório, e pelo controlo da esterilidade da solução salina, utilizada para a realização de testes de identificação e suscetibilidade a antimicrobianos, que é efetuada através da sua inoculação numa placa de gelose de sangue.

Relativamente ao controlo de qualidade externo, este é realizado uma ou duas vezes por ano, consoante o setor em questão, e é mediado por uma entidade nacional, o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, e uma internacional, o RIQAS (Randox International Quality Assessment Scheme).

## **2.2 Setor de Bioquímica**

No setor de Bioquímica são analisados vários tipos de amostras, que se relacionam com os tipos de testes a realizar. São elas: amostras de sangue total com Heparina; amostras de sangue total com EDTA; amostras de soro; amostras de urina e amostras de outros líquidos biológicos como Líquido cefalorraquidiano (LCR) e aspirados quísticos. As amostras de soro correspondem a cerca de 90% do total de amostras que chegam ao setor diariamente. Este tipo de amostra é obtido após ocorrer a coagulação sanguínea; os respetivos tubos contêm pequenas partículas de sílica que promovem a ativação do processo de coagulação. Todas as análises bioquímicas são efetuadas no dia da sua chegada ao setor.

Seguidamente ao seu registo, os tubos de soro são centrifugados (3000 rpm, 10 minutos), assim como os tubos com amostras de urina ou outros líquidos biológicos (1500 rpm, 10 minutos). Após centrifugação é de grande importância uma observação cuidada das amostras de modo a que se possam remover interferentes (amostras lipémicas, hemolisadas ou ictéricas e presença de fibrina) ou, caso tal não seja possível, ter em conta a sua presença aquando da validação dos resultados. Os tubos destinados à determinação de Hemoglobina glicada (HbA1c) e Cálcio ionizado passam diretamente aos respetivos equipamentos. Na Tabela i, estão apresentados os principais equipamentos do setor de Bioquímica assim como os respetivos métodos de análise.

O equipamento Cobas<sup>®</sup> 6000 c501 é o mais frequentemente utilizado e permite realizar uma vasta quantidade de testes bioquímicos, como por exemplo, as determinações

quantitativas de ferro, bilirrubina e cálcio. O Cobas 4000 c30I realiza os mesmos testes, mas o seu uso destina-se apenas a situações de emergência, como por exemplo, em caso de avaria do equipamento principal.

**Tabela i** - Principais equipamentos do Setor de Bioquímica e respetivos métodos de análise.

<b>Equipamento</b>	<b>Método de análise</b>
Cobas® 6000 c50I (Roche Diagnostics)	Espetrofotometria
Cobas® 4000 c30I (Roche Diagnostics)	Espetrofotometria
ABL® 800 Flex (Radiometer)	Potenciometria e Amperometria
RapidLab® 1265 (Siemens)	Potenciometria e Amperometria
AQT90 FLEX®	Imunoensaio
Reflotron® Plus (Roche Diagnostics)	Refratometria
RapidChem® 744 (Bayer)	Potenciometria direta

O equipamento ABL 800 realiza uma análise gasométrica das amostras, com a determinação dos vários parâmetros de oximetria. Para além disto, permite também a determinação dos valores de eletrólitos ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) com destaque para a determinação do nível de cálcio ionizado e de metabolitos, como a glucose e o lactato.

O equipamento Rapidlab 1265 determina os parâmetros de equilíbrio acido-base, níveis de oxigénio e dióxido de carbono ( $\text{pO}_2$  e  $\text{pCO}_2$ ), valor de pH, eletrólitos e metabolitos, como o lactato. Relativamente à realização da Gasometria, o aparelho mede os valores de pH, a partir do qual consegue calcular os restantes parâmetros.

O equipamento AQT90 FLEX é um sistema Point-of-care (POC), que permite a determinação de marcadores cardíacos, sendo os mais importantes: Troponina, Mioglobina e Creatinina cinase MB.

O Reflotron, equipamento de química seca, é também classificado como POC e é de utilidade aquando da necessidade de confirmações rápidas, com a vantagem de conseguir realizar a análise diretamente numa amostra de sangue total.

O aparelho Rapidchem permite a determinação dos valores de iões, nomeadamente  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ . É geralmente usado para confirmações rápidas de resultados.

## **2.3 Setor de Imunologia e Endocrinologia**

Neste setor todas as análises realizadas têm como base a formação de complexos antigénio-anticorpo. Estas são chamadas de técnicas de imunoensaio e podem ser de dois tipos: técnica de imunoensaio competitiva e técnica de imunoensaio por método de

“sandwich”. A detecção dos complexos formados pode ser feita de várias formas, entre elas, o uso de um antigénio/anticorpo ligado a uma enzima, ou o uso de um análogo marcado radioactivamente, chamada de técnica de radioimunoensaio (RIA), na qual se usa lodo reativo.

No presente setor a principal amostra é soro, no entanto são também analisados outros tipos de amostras: plasma refrigerado (centrifugação a 5°C), plasma não refrigerado (centrifugação a 15°C), urina e sangue total. Mais uma vez, diferentes amostras são necessárias para diferentes determinações: a determinação da ACTH (corticotrofina) tem de ser feita em plasma refrigerado; a PTH (hormona da paratiroide) tem de ser determinada em plasma não refrigerado; é necessário sangue total para a determinação de Hb e são utilizadas amostras de urina para a pesquisa de proteinúria de Bence-Jones.

**Tabela ii** - Principais equipamentos do Setor de Imunologia/Endocrinologia e respetivos métodos de análise.

Equipamentos		Método de análise
VersaCell®X3 (Siemens)	Immulite® 2000 XPi (Siemens)	Imunoensaios com detecção por quimioluminescência
	ADVIA Centaur® XP (Siemens)	
Kryptor® Compact Plus (Brahms instruments)		Imunoensaios por técnica de sandwich com detecção por fluorescência
Cobas® 6000 e601 (Roche Diagnostics)		Imunoensaios com detecção por eletroquimioluminescência
BN ProSpec® (Siemens)		Imunoensaios com detecção por neflometria
Optilite® (Binding site)		Imunoensaios com detecção por turbidimetria
Hydrasis® (Sebia)		Eletroforese

Neste setor está delineado um circuito específico que define a ordem de passagem das amostras pelos equipamentos. Os principais equipamentos e os respetivos métodos de determinação apresentam-se, pela ordem realizada em laboratório, na Tabela ii.

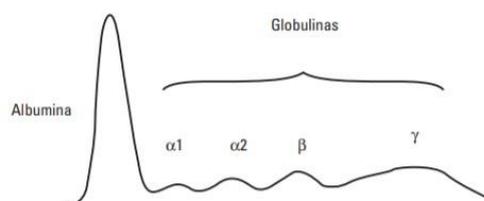
Além dos aparelhos aqui mencionados, existem no laboratório outros de uso menos frequente, nomeadamente, o VIVA-E® (Siemens), para a determinação das concentrações de vale e pico de fármacos; o Liaison® (DiaSorin) e o MAGO®4, para a pesquisa de doenças autoimunes.

Os parâmetros alvo de determinação no Setor de Imunologia são vários: marcadores tumorais, hormonas, imunoglobulinas, metabolitos, proteínas reativas, entre outros. Alguns destes parâmetros necessitam de ser determinados por técnicas laboratoriais manuais, tais como: Metanefrina e Normetanefrina (metabolitos das catecolaminas Epinefrina e Norepinefrina, respetivamente); Testosterona livre, determinada por técnica de RIA; ácido 5-hidroxi-3-indol acético (5-HIAA), um metabolito urinário da Serotonina; entre outros.

Todas estas técnicas manuais consistem em imunoensaios competitivos que diferem no modo de deteção dos complexos formados.

O Hydrasis® é um sistema semi-automatizado que efetua análises por eletroforese em gel de agarose. De entre os testes realizados por este sistema destaca-se a deteção qualitativa de proteína de Bence-Jones por imunofixação, o proteinograma e a separação das frações de hemoglobina.

Os proteinogramas permitem a separação eletroforetica de proteínas humanas séricas e urinárias em seis frações principais: Albumina,  $\alpha$ -1-globulinas,  $\alpha$ -2-globulinas,  $\beta$ -1-globulinas,  $\beta$ -2-globulinas e  $\gamma$ -globulinas (Figura 1). As alterações observadas nos proteinogramas podem estar



**Figura 1** - Gráfico de um proteinograma normal.  
Fonte: (Silva, Lopes e Faria, 2008)

associadas a inúmeras patologias, auxiliando no seu diagnóstico. Alguns exemplos de associações a patologias são: a diminuição da fração da albumina em casos de infeções crónicas; a diminuição das  $\alpha$ -2-globulinas nas anemias megaloblásticas; o aumento das  $\beta$ -globulinas em doentes com anemia por deficiência de ferro e o aumento da fração das  $\gamma$ -globulinas em casos de mieloma múltiplo, linfoma e leucemia linfocítica crónica. (Vavricka et al., 2009)

## 2.4 Setor de Microbiologia

No Setor de Microbiologia são analisados produtos biológicos com o intuito de averiguar a presença de microrganismos patogénicos, assim como de proceder à sua identificação e obtenção dos perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos, essencial à elaboração da estratégia terapêutica mais adequada. Na Tabela iii estão apresentados os equipamentos presentes no Setor de Microbiologia, bem como as respetivas funções e testes realizados.

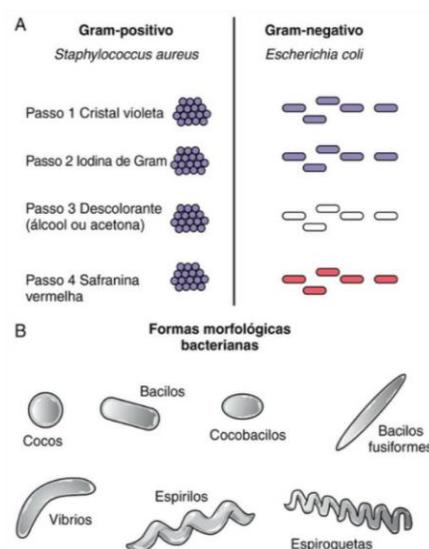
**Tabela iii** - Principais equipamentos do Setor de Microbiologia e respectivas funções/testes desempenhados.

Equipamento	Teste/Função
Estufas	Local para incubação de microrganismos em meios e temperaturas adequados
Frigoríficos	Armazenamento de amostras, reagentes e meios para cultura
Câmara de fluxo laminar	Obtenção de uma área de trabalho estéril e segura para a manipulação de materiais biológicos ou estéreis
Cobas® u411 (Roche Diagnostics)	Analisador semi-automático para determinação dos parâmetros bioquímicos incluídos na análise sumária de urina
Vitek® 2 Compact 15 (BioMérieux)	Sistema automatizado para a realização de testes de identificação (ID) e de suscetibilidade a antimicrobianos (TSA)
BD Bactec™ 9050 Blood Culture System	Sistema automatizado para a incubação de culturas de sangue e detecção de crescimento de microrganismos nas mesmas
GeneXpert® (Cepheid)	Sistema automático para realização de análise de Biologia Molecular por reação de polimerase em cadeia (PCR) em tempo real

## 2.4.1 Microbiologia

A microbiologia é definida como a ciência que se dedica ao estudo dos microrganismos. Estes podem ser subdivididos em quatro grupos gerais: os vírus, as bactérias, os fungos e os parasitas. Os vírus não foram alvo de estudo durante o estágio realizado e, portanto, não serão abordados neste relatório. Os microrganismos possuem a capacidade de estabelecer vários tipos de interações com os seres vivos que rodeiam, podendo constituir causa de doença no hospedeiro, nomeadamente, de doenças infecciosas. (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2014) (Brooks *et al.*, 2014)

As **bactérias** são seres procariotas e, portanto, unicelulares, visíveis apenas com o auxílio de um microscópio ótico. Estes microrganismos podem ser classificados de



**Figura 2 A**, morfologia da coloração de Gram bacteriana. **B**, morfologias bacterianas.

Fonte: (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2014)

acordo com critérios microscópicos (forma, tamanho, morfologia e cor quando sujeitas a coloração específica, como ilustrado na Figura 2A e 2B); macroscópicos, pelas características de crescimento das suas colónias, produtos de metabolismo e necessidades metabólicas e pelo seu genótipo. (Brooks *et al.*, 2014) (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2014)

Os **fungos** são organismos eucariotas que possuem uma rígida parede celular composta por quitina e uma membrana celular cujo principal componente é o ergosterol. Estes microrganismos possuem um crescimento lento, com um tempo de multiplicação celular na ordem das horas. (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2014) A taxonomia clássica dos fungos baseia-se fundamentalmente na sua morfologia e na produção de esporos. (Brooks *et al.*, 2014)

Os **parasitas** podem ser definidos como organismos que vivem em associação com um segundo ser de espécie diferente a que se dá o nome de hospedeiro. Os parasitas com capacidade de causar doença no ser humano podem ser divididos em dois grupos principais: parasitas unicelulares, pertencentes ao reino Protista, sub-reino Protozoa, denominados de Protozoários; e aqueles que fazem parte do reino Animalia, sub-reino Metazoa, com o nome de Metazoários. Neste último grupo estão inseridos os Helmintas. (Kayser *et al.*, 2005) Para a identificação laboratorial dos parasitas são analisadas as suas características morfológicas e, para além disso, pode também recorrer-se a técnicas imunocromatográficas para a pesquisa de antigénios parasitários.

#### 2.4.2 Produtos Biológicos

A pesquisa e caracterização de microrganismos são realizadas em amostras de produtos biológicos. As amostras sobre as quais recaem as análises do Setor de Microbiologia são várias, nomeadamente: urina; fezes; pús; exsudados; secreções do aparelho respiratório; pontas de cateter, entre outras. O processo da colheita das amostras deve obedecer a algumas regras gerais: devem ser efetuadas antes de ser iniciada a terapêutica antibiótica; deve ser evitada a contaminação da amostra pela microbiota, quer do doente, quer do ambiente e os materiais de colheita devem ser esterilizados; tal como os recipientes, que devem também ser inquebráveis e fechados hermeticamente. (Fonseca, Sebastião e Cardoso, 2004)

### 2.4.2.1 Urina

As amostras de urina são as que mais frequentemente chegam ao Setor para análise. A sua análise tem como objetivo diagnosticar infeções do trato urinário, a partir da identificação do agente etiológico. (Abdelraouf A. Elmanama, 2007)

As infeções do trato urinário (ITU) são as mais comuns, sendo *Escherichia coli* a principal causa deste tipo de infeções, com 70-95% dos casos. Em ambiente hospitalar, podem também ser identificadas como agentes etiológicos outras Enterobacteriaceae, como *Proteus mirabilis* e *Klebsiella* sp. (Bhattacharjee et al., 2017)

Nos casos de doentes internados, aumentam os riscos de ITU assim como o leque de agentes etiológicos na sua origem. O internamento está associado a riscos aumentados que advém de situações como a algaliação permanente, aplicação de tubos de nefrostomia, cálculos urinários, entre outros fatores, que podem levar ao aparecimento de ITU causadas por microrganismos como: *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase* negativa, *Enterococcus* spp. e fungos, sendo que as infeções micológicas estão particularmente associadas a doentes sob terapêutica antibiótica. (Fonseca, Sebastião e Cardoso, 2004)

A colheita de urina pode ser efetuada por vários métodos, nomeadamente, colheita do jato intermédio; punção supra-púbica; punção de cateter urinário ou drenagem de nefrostomia/ureterostomia. A primeira amostra da manhã é aquela cuja contagem bacteriana é maior, uma vez que esteve sujeita a incubação durante todo o período da noite, e, por esta mesma razão, corresponde à melhor amostra para análise. (Abdelraouf A. Elmanama, 2007) (Fonseca, Sebastião e Cardoso, 2004)

#### a) Processamento

A análise das amostras de urina pode ser de dois tipos: análise sumária de urina, também chamada de urina tipo II, e urocultura.

A **análise sumária de urina** inclui o exame físico, químico e microscópico da urina e tem como principais objetivos a pesquisa de bacteriúria, hematúria e/ou proiteinúria. (Mota e Beça, 2018) Nesta análise são então determinados vários parâmetros, nomeadamente: densidade, cor, pH, aspeto, corpos cetónicos, urobilinogénio, bilirrubina, nitritos, leucocitúria, proteinúria, glicosúria, hematúria, células epiteliais, cilindros e cristais. Os parâmetros bioquímicos são determinados com o auxílio de tiras de teste Combur<sup>10</sup> Test M, as quais são mergulhadas na amostra e, seguidamente, analisadas no equipamento Cobas u 411. A presença de cilindros e cristais é determinada pela análise do sedimento urinário ao

microscópio ótico, ou seja, pelo seu exame direto a fresco. (Fonseca, Sebastião e Cardoso, 2004). Este sedimento é obtido após centrifugação da urina a 1500 r.p.m. durante 5 minutos e após descarte do sobrenadante e é, então, analisado sobre uma lâmina e sob lamela, ao microscópio, à objetiva de 40x e com o condensador para baixo. É necessário serem observados, pelo menos, 10 campos para assegurar a validade dos resultados.

A presença de nitritos urinários está muito associada à existência de ITU, pois alerta para a presença de bacteriúria, na medida em que são necessárias, para além das condições adequadas como um período de tempo suficiente, bactérias em quantidade suficiente para fazerem a conversão dos nitratos em nitritos. (Sato *et al.*, 2006) Sempre que o resultado é positivo para a presença de nitritos a análise é repetida para confirmação.

A leucocitúria, só por si, não auxilia no diagnóstico de ITU, uma vez que existem várias causas de leucocitúria não relacionadas com infeções (exs.: neoplasias e patologias a nível renal). No entanto, a presença de leucocitúria com agrupamentos, em associação com outros sinais ou sintomas característicos, pode ser muito útil no diagnóstico de ITU. (Abord *et al.*, 2003) (Neto, 2000)

A hematúria, tal como a leucocitúria, só por si não indica necessariamente que estamos na presença de uma ITU, podendo estar relacionada com situações como a presença de cálculos renais ou tumores. A presença de hematúria deve ser então interpretada tendo em conta outros sinais e sintomas. (Abord *et al.*, 2003)

A confirmação do diagnóstico de uma ITU é possível pela observação do crescimento de microrganismos em **urocultura**. Nestes exames culturais, a urina é semeada em meios de cultura apropriados e o crescimento de microrganismos é avaliado quantitativamente (número de colónias) e qualitativamente (identificação do agente e realização de testes de suscetibilidade a antimicrobianos). (Neto, 2000) (Abdelraouf A. Elmanama, 2007)

## **Exame bacteriológico**

As bactérias conseguem crescer em meios sólidos que contenham agar. Estes meios, embora tenham o agar como base, podem variar na sua composição, permitindo avaliar o metabolismo bacteriano consoante o seu crescimento em determinado meio. (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2014)

As amostras, neste caso as de urina, são então semeadas com o auxílio de uma ansa calibrada de 10 µL (método de sementeira quantitativa) em meios apropriados, nomeadamente, em agar cistina-lactose-deficiente em eletrólitos (CLED) e gelose Columbia com sangue, colistina e ácido nalidíxico (CNA). No meio CLED crescem bactérias Gram-

positivo, Gram-negativo e leveduras. Este meio permite diferenciar colónias fermentadoras de lactose (adquirem cor amarela) de não fermentadoras (incolores/adquirem cor do meio). O meio CNA permite a cultura seletiva de bactérias Gram-positivo, isto porque contém antibióticos na sua composição que impedem o crescimento de bactérias Gram-negativo.

As placas assim semeadas incubam em condições de aerobiose, a 37°C e são observadas após 18-24 horas.

### **Exame micológico**

Semeiam-se as amostras em gelose Sabouraud com cloranfenicol e gentamicina (SGC2). O cloranfenicol é um antibiótico que inibe a síntese proteica em organismos procariotas, sendo ativo contra as bactérias Gram-negativo e Gram-positivo. A gentamicina é também um agente bactericida, pertencente à família dos aminoglicosídeos. Este antibiótico é ativo contra bactérias Gram-negativo, interferindo com a sua síntese proteica. A gelose SGC2 é, portanto, um meio indicado para o crescimento de fungos, uma vez que impede o crescimento bacteriano. (Curtis *et al.*, 2008) (Santos, Sousa e Santana, 2014)

As geloses de SGC2, depois de semeadas, incubam em condições de aerobiose a 30°C. A temperatura mais adequada para a incubação de fungos depende da amostra biológica em que são pesquisados e da temperatura a que estão associados.

São sempre semeadas duas placas de gelose SGC2 por amostra, um bom método para detetar casos de contaminação. As contaminações das placas para pesquisa de fungos são combatidas pelo isolamento das placas com parafilme, de modo a impedir a saída ou entrada de esporos fúngicos. Esta metodologia associada à sementeira em placas de SGC2 aplica-se a todo o tipo de amostras que seja semeado nesta gelose.

As placas para averiguar o crescimento de fungos filamentosos incubam durante um mês e são observadas semanalmente.

#### **b) Interpretação de resultados**

### **Exame bacteriológico**

Consideram-se positivas as amostras de urina de jato intermédio com crescimento  $\geq 10^5$  unidades formadoras de colónias (UFC)/mL por placa. Nos casos em que há crescimento de dois ou mais tipos de colónias, em que um deles é claramente predominante, valoriza-se o mais abundante.

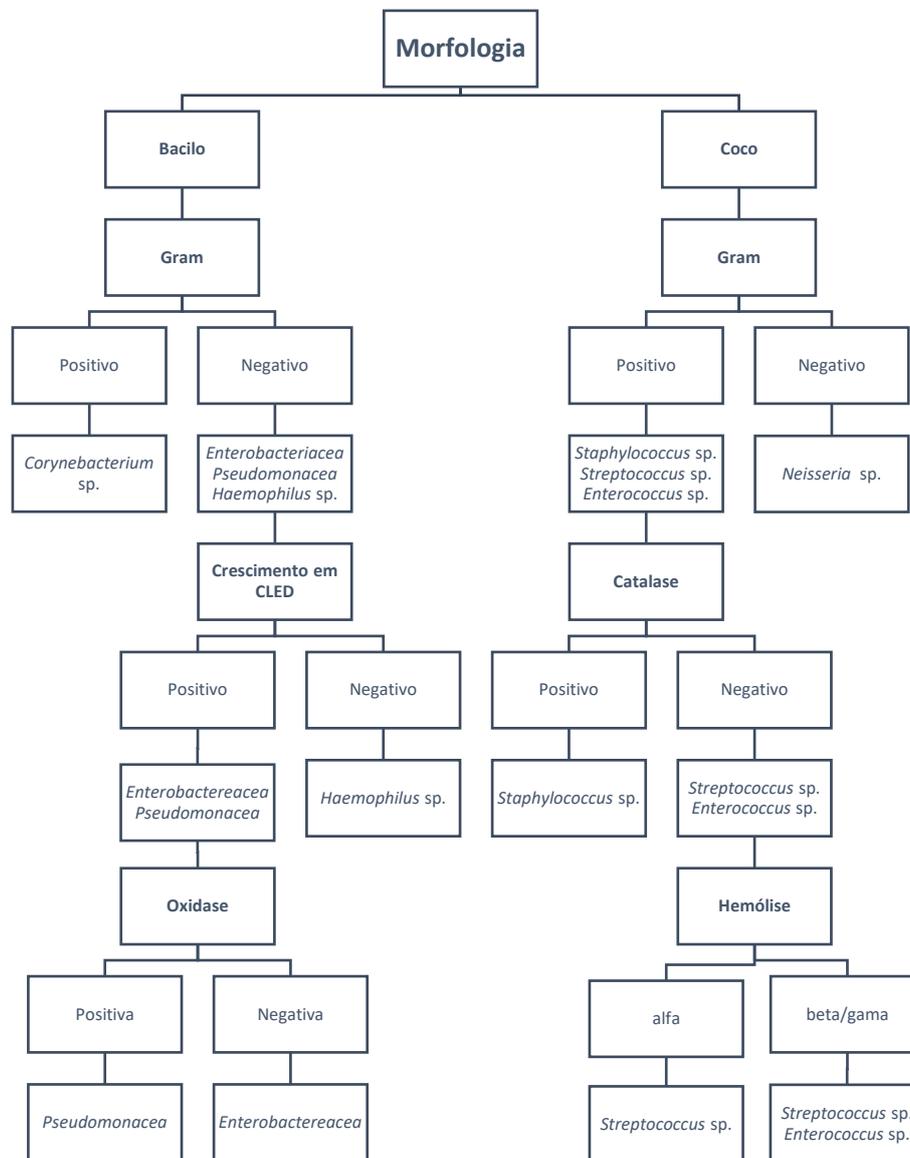
São sempre realizados testes de identificação (ID) e suscetibilidade a antibióticos (TSA) até um máximo de crescimento de três tipos de colónias diferentes. Quando há

crescimento de mais do que três tipos de microrganismos diferentes o resultado dá-se como polimicrobiano. Casos em que a contagem de colónias é  $<10^5$  UFC/mL só são valorizados em contexto de cultura pura em imunodeprimidos ou em controlos pós-terapêutica para o microrganismo em questão. Dependendo do meio em que há crescimento e da cor das colónias obtidas, pode concluir-se se o microrganismo é Gram-positivo (maior crescimento em CNA), Gram-negativo (cresce apenas em CLED), fermentador (colónias amarelas em CLED) ou não fermentador de lactose (colónias incolores em CLED). Para os casos definidos como positivos, podem realizar-se vários testes para a identificação da bactéria, nomeadamente: testes rápidos para identificação presuntiva do género. Estes testes permitem que, seguidamente, se realizem as provas de ID e o TSA no aparelho Vitek® 2 Compact 15, que permitem, respetivamente, a identificação definitiva do microrganismo, definindo a sua espécie, e a obtenção do seu perfil de suscetibilidade. Podem realizar-se vários testes bioquímicos rápidos para o auxílio na identificação dos microrganismos, de entre eles, o teste da catalase e o da oxidase são os mais frequentemente efetuados.

O teste da catalase permite diferenciar *Staphylococcus* sp. de *Streptococcus* sp. ou *Enterococcus* sp., enquanto o teste da oxidase é útil para a identificação de bactérias Gram-negativo e para diferenciar entre as famílias *Pseudomonadaceae* e *Enterobacteriaceae*. Podem também efetuar-se, embora menos frequentemente, os testes da coagulase e da urease. A bactéria *Staphylococcus aureus* apresenta positividade para o teste da coagulase, permitindo diferenciá-la das outras espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativas. O teste da urease é útil para diferenciar as *Enterobacteriaceae* urease-positiva, nomeadamente, *Proteus* sp. e *Klebsiella* sp., das restantes (os procedimentos e princípios associados a estes testes encontram-se explicados nos Anexos). (Zurita, Mejía e Blanco, 2010) (Vuye e Pijck, 2013)

Algumas espécies de bactérias têm capacidade de realizar hemólise. Existem três tipos de hemólise bacteriana:  $\alpha$ -hemólise, se a reação de hemólise for apenas parcial;  $\beta$ -hemólise, quando a reação é total e  $\gamma$ -hemólise, quando é inexistente. Esta reação pode ser observada quando se faz a sementeira das amostras em meios sólidos à base de sangue. (Crispima e Oliveira, 2014)

Na Figura 3 encontra-se representado o processo sequencial, anteriormente descrito, que conduz à identificação do género da bactéria em estudo. Este processo envolve uma análise da morfologia, do crescimento em diversos tipos de meio e das características bioquímicas. Esta análise sequencial aplica-se ao exame bacteriológico das amostras no geral.



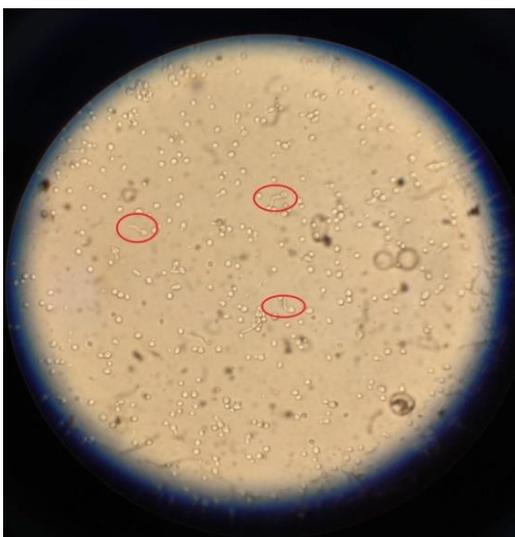
**Figura 3** – Esquema usado no Setor de Microbiologia do IPO de Coimbra como guia no processo de identificação.

### Exame micológico

No final do período estabelecido para incubação, passa-se à identificação dos casos positivos, que são repicados para gelose chocolate PolyViteX (PVX). Os fungos que demonstrem crescimento em gelose SGC2 são sempre repicados para PVX para posterior identificação, qualquer que seja a amostra em estudo. Este meio é enriquecido com sangue e não contém antibióticos, permitindo o crescimento de organismos fastidiosos.

Os fungos podem ser unicelulares ou multicelulares e, consoante a sua morfologia, podem ser agrupados em leveduras e fungos filamentosos. As leveduras consistem em células isoladas de forma esférica a elipsoide, e a sua reprodução ocorre geralmente por gemulação. Algumas espécies produzem gémulas que não se libertam da célula mãe, acabando por dar origem a estruturas mais alongadas, as pseudo-hifas, características do fungo *Candida albicans*. (Barbedo e Sgarbi, 2010)

As leveduras são identificadas pela realização do teste ID no aparelho VITEK 2-compact. O teste do tubo germinativo é uma metodologia laboratorial para a identificação



**Figura 4** - Imagem microscópica de uma suspensão obtida para a realização do teste do tubo germinativo. Pode observar-se crescimento de tubos germinativos (assinalados a vermelho).

Fonte: Setor de Microbiologia do IPO de Coimbra

de *C. albicans*. Este teste baseia-se na capacidade de o fungo produzir tubo germinativo quando na presença de soro humano ou animal (teste explicado com mais detalhe em Anexo). A positividade do teste é averiguada pela observação ao microscópio ótico (Figura 4) de uma gota da suspensão, obtida pela adição de uma colónia isolada de cultura em soro. O crescimento de tubo germinativo é característico de *C. albicans*, a ausência de crescimento é indicativa de que estamos na presença de uma *Candida* sp. não *albicans*. (Brooks et al., 2014) (Miotto et al., 2004) (Coradi, Gonçalves e Gonçalves, 2017)

#### 2.4.2.2 Fezes

A análise microbiológica de amostras de fezes tem como objetivo a pesquisa de infeções gastrointestinais. (Fonseca, Sebastião e Cardoso, 2004)

O trato gastrointestinal permanece habitado por uma diversa população de microrganismos ao longo de toda a vida do hospedeiro. A microbiota comensal e os agentes patogénicos mais comuns do trato gastrointestinal estão apresentados na Figura 5. A constituição desta população permanece relativamente constante, a menos que fatores exógenos, como a antibioterapia, perturbem o equilíbrio da microbiota. (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2014)

Devem ser colhidas, para análise, pelo menos três amostras de fezes, obtidas em dias diferentes, de modo a garantir a viabilidade dos resultados. Estas amostras devem ter, aproximadamente 1 a 2 gramas, e, se possível, devem incluir uma porção com muco, pús ou sangue. As amostras não podem estar contaminadas com urina e devem ser processadas até duas horas após a sua emissão. (Fonseca, Sebastião e Cardoso, 2004) (Abdelraouf A. Elmanama, 2007)

Agentes patogénicos comuns	Microbiota comensal
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Helicobacter pylori</i></li> <li>• <i>Salmonella</i> spp.</li> <li>• <i>E. coli</i> O157:H7</li> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>• <i>Campylobacter</i> spp.</li> <li>• <i>Vibrio cholerae</i></li> <li>• <i>Yersinia enterocolitica</i></li> <li>• <i>Clostridium difficile</i></li> <li>• <i>Shigella</i> spp.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enterobactérias não incluídas dentro dos patogénicos comuns</li> <li>• <i>Bacteroides</i> spp.</li> <li>• <i>Streptococcus</i> spp. <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Lactobacillus</i></li> </ul> </li> <li>• <i>Pseudomonas</i> spp.</li> <li>• <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase negativa <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Clostridium</i></li> </ul> </li> <li>• <i>Peptostreptococcus</i></li> </ul>

**Figura 5** - Agentes patogénicos comuns e microbiota comensal do trato gastrointestinal. Fonte: (Abdelraouf A. Elmanama, 2007)

## a) Processamento

### Exame bacteriológico

O exame bacteriológico de amostras de fezes consiste na pesquisa de *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Campylobacter* spp.

O género *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, sendo bacilos Gram-negativo móveis através de flagelos. Estas bactérias são anaeróbias facultativas e fermentadoras de glicose. (Baú, Siqueira e Mooz, 2009)

As bactérias do género *Shigella* pertencem também à família *Enterobacteriaceae*. Estes microrganismos são bacilos Gram-negativo imóveis. Relativamente ao seu metabolismo, são aeróbios facultativos e têm capacidade de fermentar a glicose. (Cunha et al., 2017)

O género *Campylobacter* pertence à família *Campylobacteriaceae*. Estas bactérias, morfológicamente, são bacilos espiralados, móveis e Gram-negativo. Estes microrganismos não fermentam nem oxidam açúcares. Uma característica marcante deste género é a microaerofilia, que se define pela necessidade de um ambiente com uma baixa quantidade de oxigénio para o seu crescimento. (Flores et al., 2014) (Theophilo et al., 2011)

A sementeira das amostras é feita em dois tipos de meio sólido, nomeadamente, Hektoen (HEK) e em meio xilose-lisina-desoxicolato (XLD), e em dois caldos de enriquecimento, o caldo de Selenito-F e o caldo para Gram-negativo (GN). As geloses HEK e XLD são usadas para o isolamento de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. A composição da gelose HEK inclui sais biliares, que inibem o crescimento de bactérias Gram-positivo e retardam o crescimento de algumas Enterobactérias, permitindo assim o crescimento seletivo dos microrganismos de interesse. O meio XLD é composto por sais biliares, xilose,

lisina, lactose, sacarose e sal férrico. Os caldos de Selenito-F e GN são meios líquidos de enriquecimento para *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. O caldo Selenito-F contém selenito de sódio na sua composição, que inibe o crescimento da maioria das Enterobactérias, incluindo algumas estirpes de *Shigella* spp. O caldo GN contém citrato e deoxicolato, que inibem o crescimento da maioria das *Enterobacteriaceae* da microbiota intestinal normal e todos os tipos de bacilos formadores de esporos. Este caldo possui também na sua composição manitol, que é metabolizado quer por *Salmonella* spp. quer por *Shigella* spp., promovendo o seu crescimento seletivo. A repicagem dos caldos de enriquecimento para meio sólido deve ser feita entre as 6 e as 12 horas, que corresponde ao prazo médio de inibição de outras bactérias, como *Proteus* spp. (Fonseca, Sebastião e Cardoso, 2004) (Ferrari *et al.*, 2009)

As amostras semeadas em HEK e XLD incubam em aerobiose, a 37°C, durante 18 a 24 horas. Amostras de fezes em caldos de enriquecimento incubam em aerobiose, a 37°C, até 12 horas, após as quais são repicados para um meio dos meios sólidos referidos.

Para a pesquisa de *Campylobacter* spp. é realizado um teste imunocromatográfico. Os testes positivos têm de ser confirmados com cultura em gelose seletiva para *Campylobacter* spp., nomeadamente, a gelose Campylozel (CAM), com incubação em condições microaerófilas (5% O<sub>2</sub> + 10% CO<sub>2</sub> + 85% N<sub>2</sub>) a 42°C, durante 72 horas.

### **Pesquisa de *Clostridium difficile***

Para a pesquisa de *Clostridium difficile* devem ser utilizadas fezes diarreicas. (Fonseca, Sebastião e Cardoso, 2004)

No Setor de Microbiologia do IPO de Coimbra é realizado um teste rápido imunocromatográfico baseado na formação de complexos antigénio-anticorpo, para deteção qualitativa do antigénio da enzima glutamato-desidrogenase (GDH) de *C. difficile* nas amostras de fezes.

### **Exame micológico**

Processamento idêntico ao descrito para amostras de urina.

### **Exame parasitológico**

A análise das três amostras, colhidas em dias consecutivos, é particularmente importante no exame parasitológico, uma vez que a libertação de algumas estruturas parasitárias é intermitente, evitando-se assim a obtenção de resultados falsamente negativos. (Fernandes *et al.*, 2012)

Para o exame parasitológico de amostras de fezes deve começar-se pela análise macroscópica das mesmas. Macroscopicamente podem avaliar-se parâmetros como a consistência e o odor das fezes, a presença de restos alimentares e a existência de elementos anormais como muco, sangue ou vermes adultos. O exame direto permite a observação microscópica de protozoários (trofozoítos ou quistos) e helmintas (ovos, larvas ou proglótis), em lâminas com lugol para facilitar a observação. Este tipo de exame só se aplica a fezes recém-emitidas (até 30 minutos) e diarreicas. A observação microscópica para a detecção de estruturas parasitárias deve ser feita com as objetivas de ampliação de 10x e 40x.

## b) Interpretação de resultados

### **Exame bacteriológico**

O objetivo da sementeira das amostras em meio HEK e XLD é averiguar a presença de colónias características de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. Devem ser valorizadas colónias não fermentadoras de lactose, uma vez que nenhum destes microrganismos tem capacidade de fermentar este açúcar. (Fonseca, Sebastião e Cardoso, 2004) Em meio HEK, os microrganismos fermentadores de lactose dão origem a colónias de cor salmão, enquanto aqueles que não têm capacidade de fermentar este açúcar originam colónias de cor esverdeada, uma vez que adquirem a cor do próprio meio. Em gelose XLD, as bactérias que acidificam o meio, ou seja, que fazem fermentação, adquirem cor amarela, enquanto aquelas que o tornam mais alcalino apresentam-se vermelhas, mais uma vez adquirindo a cor do próprio meio. (Ferrari *et al.*, 2009) *Salmonella* spp. tem outra característica que permite a sua diferenciação em meio HEK: as colónias deste microrganismo são produtoras de H<sub>2</sub>S (sulfato de hidrogénio). O citrato de amónia férrico e o tiosulfato de sódio, componentes deste meio, permitem detetar a produção de H<sub>2</sub>S, atribuindo a estas colónias um centro de cor negra. (Guerra, 2015)

Relativamente aos caldos de enriquecimento, a presença de turvação nestes meios alerta para a positividade das amostras.

Relativamente à pesquisa de *Campylobacter* spp., o crescimento bacteriano em gelose Campyloset deve ser valorizado pela elaboração e observação microscópica de um esfregaço posteriormente corado pela técnica de Gram. Esta observação é considerada positiva caso sejam encontrados bacilos Gram-negativo em forma de “asa de gaivota” ou “S”, característicos do género *Campylobacter* spp., neste caso, é posteriormente efetuada a identificação da espécie em causa e o TSA.

## **Pesquisa de *Clostridium difficile***

Apesar dos resultados negativos por parte do teste imunocromatográfico para detecção de *C. difficile* serem fidedignos, há uma elevada propensão para a obtenção de resultados falsamente positivos. Os resultados positivos obtidos por imunocromatografia necessitam, então, de ser confirmados pela realização de um teste de Biologia Molecular por PCR em tempo real, que averigua a presença das toxinas (toxina B e toxina binária) de *C. difficile* com elevada especificidade e sensibilidade e que permite a confirmação do diagnóstico.

## **Exame micológico**

As placas que apresentem crescimento fúngico devem ser repicadas para meio PVX para posterior identificação. O crescimento de leveduras deve ser valorizado apenas em contexto de ausência de crescimento bacteriano, uma vez que estas fazem parte da microbiota entérica normal.

## **Exame parasitológico**

Os casos positivos de exame parasitológico são detetados pela observação microscópica de ovos, quistos, trofozoítos ou vermes e pela avaliação das características dos mesmos, que permitem diferenciar os parasitas em género e, em alguns casos, também em espécie. A presença de vermes adultos pode ser detetada pela observação das amostras a fresco e a olho nu, enquanto as características dos mesmos podem ser determinadas por uma observação mais cuidada ao microscópio ótico.

### **2.4.2.3 Sangue**

Bacteriémia é o termo utilizado para definir a presença de microrganismos viáveis na corrente sanguínea, situação que pode conduzir ao aparecimento de uma Infecção da Corrente Sanguínea (ICS). Este tipo de infeção é de grande relevância em termos de diagnóstico, uma vez que está associada a um aumento considerável nas taxas de morbilidade e mortalidade, além de que representa uma das mais significativas complicações do processo infeccioso. (Araújo, 2012) (Fonseca, Sebastião e Cardoso, 2004)

As hemoculturas, culturas de sangue total, são um exame de importante valor preditivo de infeção, uma vez que a sua positividade é um indicador altamente específico de ICS, sendo o sangue um produto biológico estéril. (Abdelraouf A. Elmanama, 2007) (Araújo, 2012) (Fonseca, Sebastião e Cardoso, 2004)

Podem também ser detetadas infecções na corrente sanguínea causadas por fungos. De entre os doentes que apresentam maior risco de desenvolver um quadro de bacteriemia ou fungemia encontram-se aqueles que são portadores de patologias hematológicas, neoplasias e aqueles que se encontram imunodeprimidos. (Araújo, 2012)

A colheita de amostras de sangue para hemocultura é efetuada por punção venosa de qualquer uma das veias periféricas. Devem ser sempre colhidas, pelo menos, duas amostras para hemocultura, por doente e, nos casos em que o doente se encontra cateterizado, deve também ser colhida amostra do cateter. O volume de sangue colhido por frasco de hemocultura deve respeitar a proporção recomendada pelo fabricante em relação ao meio de cultura, que é, neste caso, entre 8 e 10 mL, com exceção dos frascos destinados à pesquisa de micobactérias (nestes casos o volume fixa-se entre 1 e 5 mL). É criticamente importante respeitar o volume recomendado uma vez que um frasco demasiado cheio ou demasiado vazio pode levar à obtenção de resultados erróneos, e também porque a concentração dos microrganismos é baixa na maioria das bacteriemias. (Fonseca, Sebastião e Cardoso, 2004)

Os frascos para hemocultura contêm meio tripticase soja, assim como uma resina quelante de antibióticos e um anticoagulante, nomeadamente, polisulfonato. Existem diferentes tipos de frascos para hemoculturas, sendo que a utilização de cada um depende do grupo de microrganismos que é alvo de pesquisa. São usados frascos específicos para: aeróbios, anaeróbios e micobactérias. As hemoculturas para pesquisa de microrganismos anaeróbios apenas são colhidas, em frasco apropriado, quando o exame é solicitado pelo clínico. Nestes casos, são colhidos conjuntamente com uma amostra para pesquisa de aeróbios. Para a pesquisa de fungos o processo de colheita é idêntico, sendo uma das amostras colhidas para um frasco específico para anaeróbios, e outra para aeróbios. Para a pesquisa de micobactérias é usado um frasco específico para estes microrganismos, contendo caldo de Middlebrook, e são, igualmente, colhidas duas amostras para análise.

#### a) Processamento

Os frascos de hemocultura são incubados em equipamento próprio, o BACTEC 9050, que mantém as amostras em agitação a 35°C. Este sistema de análise baseia-se na deteção da produção de CO<sub>2</sub> com origem no metabolismo microbiano. Esta deteção é feita por fluorescência e permite a monitorização da concentração de CO<sub>2</sub>, efetuada a cada 10 minutos. A fluorescência é detetada por um microprocessador, permitindo dar o resultado

como positivo ou negativo. (Guareze e Bordignon, 2018) Os frascos de hemoculturas permanecem no equipamento até 7 dias para avaliação de crescimento bacteriano e 14 dias no caso da pesquisa de fungos. Se, após o período de tempo definido, não for detetado crescimento, o equipamento dá as amostras como negativas.

As amostras para pesquisa de aeróbios consideradas como positivas pelo equipamento são repicadas para gelose Columbia (COS) e, a partir das mesmas, são preparadas lâminas para a realização da técnica de coloração de Gram. No caso de não se verificar desenvolvimento de microrganismos em meio COS e, contrariamente, se observar a sua presença ao microscópio ótico após coloração de Gram, a repicagem é efetuada para meio PVX. Os meios inoculados incubam a 37°C durante 24 a 48 horas. O meio COS contém na sua composição substâncias específicas, como sangue, o que faz deste um meio especialmente direcionado para a multiplicação, isolamento ou identificação de microrganismos. A gelose PVX é enriquecida pela hemólise dos eritrócitos que fazem parte da sua composição, graças ao aquecimento prévio do sangue. Este meio favorece o crescimento de microrganismos fastidiosos como *Neisseria* spp. e *Haemophilus* spp, sendo que microrganismos pertencentes ao último género mencionado necessitam da presença de fator X (hemina) e fator V (NAD - dinucleótido de nicotinamida adenina) para se desenvolverem, fatores estes que se encontram presentes no interior dos eritrócitos. (Fonseca, Sebastião e Cardoso, 2004)

A técnica de Coloração de Gram (procedimento em Anexo), que consiste na observação microscópica, à objetiva de 50x (imersão em óleo) do esfregaço de modo a averiguar a presença de microrganismos, divide as bactérias em dois grupos com base em diferenças estruturais das suas paredes celulares. Esta técnica é rápida, eficaz e ajuda a estabelecer um diagnóstico inicial. As bactérias Gram-positivo possuem uma camada de peptidoglicano de grossura e resistência consideráveis que permite reter o corante primeiramente adicionado (Violeta de Genciana), apresentando-se, portanto, coradas de roxo. As bactérias Gram-negativo, tendo uma camada de peptidoglicano mais fina, não retêm o corante inicial, que é facilmente removido pelo diferenciador. Estas bactérias adquirem a cor do último corante adicionado (Fuscina de Ziehl diluída), apresentando-se cor-de-rosa. (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2014) (Brooks *et al.*, 2014)

No caso de positivarem amostras para pesquisa de anaeróbios, são também elaborados esfregaços para serem corados pela técnica de Gram, e a sua repicagem é feita para meio COS e agar Schaedler com 5% de sangue (SCS). O meio SCS é incubado a 37°C em atmosfera seletiva para o crescimento de microrganismos anaeróbios, obtida pela

utilização do sistema GENbag, que consiste numa bolsa plástica onde estão presentes um gerador de atmosfera anaeróbia e um indicador para controlo da mesma. O meio COS incuba em condições de aerobiose, a 37°C, servindo de controlo: um microrganismo anaeróbio estrito não cresce em aerobiose. A gelose SCS é um meio de cultura específico para o crescimento de microrganismos anaeróbios. (Fonseca, Sebastião e Cardoso, 2004)

## b) Interpretação de resultados

Nos casos em que são detetados cocos Gram-positivo em cacho nas hemoculturas de determinado doente, é realizado um teste de PCR em tempo real para a pesquisa de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), em que é analisado o seu material genético, sendo o método mais preciso. (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2014)

A realização da técnica de coloração de Gram para a análise de hemoculturas é importante uma vez que, para além de informar relativamente à morfologia das colónias, permite a deteção de falsos positivos por parte do equipamento.

### 2.4.2.4 Secreções do aparelho respiratório

#### **Aparelho respiratório superior**

O aparelho respiratório superior é habitado por uma microbiota muito variável e abundante, constituída por microrganismos aeróbios e anaeróbios, no entanto, os seios paranasais e o ouvido médio constituem zonas estéreis em indivíduos saudáveis. (Fonseca, Sebastião e Cardoso, 2004)

Para a pesquisa de infeções do trato respiratório superior são analisadas, no Sector de Microbiologia, amostras de exsudados nasais, auriculares e orofaríngeos, no entanto, a chegada deste tipo de amostras é rara.

Relativamente ao trato respiratório superior, foram apenas tratadas amostras de exsudados nasais para pesquisa de MRSA para despiste de portadores. Bactérias do género *Staphylococcus* são frequentemente encontradas na cavidade nasal humana e a espécie *Staphylococcus aureus* é considerada a mais patogénica dentro do género, sendo responsável por várias infeções. (Abdelraouf A. Elmanama, 2007) Estas amostras são recebidas no laboratório em zaragatoa seca de rayon e o seu processamento baseia-se na elaboração de um teste de Biologia Molecular, por PCR em tempo real. Nestes casos não é necessária a

realização de cultura para posterior TSA uma vez que a terapêutica adequada é apenas uma, a mupirocina. A análise cultural destas amostras só é feita para controlo pós-terapêutica.

### ***Aparelho respiratório inferior***

O aparelho respiratório inferior é colonizado por organismos não patogénicos, nomeadamente, a nível pulmonar. Esta microbiota é caracterizada por uma baixa densidade de células, apesar da sua elevada diversidade. A existência de patologias pode levar a uma perda dessa diversidade, com o aumento da presença de bactérias de um dado género em detrimento de outros. Os géneros predominantemente associados à microbiota pulmonar de indivíduos saudáveis são: *Streptococcus*; *Prevotella*; *Fusobacteria* e *Veillonella*. (Costa et al., 2018)

Os agentes patogénicos mais frequentemente associados aos casos de infeção do trato respiratório inferior são: *Streptococcus pneumoniae*; *Haemophilus influenzae*; *Staphylococcus aureus*; *Klebsiella pneumoniae* e outras Enterobactérias; *Moraxella catarrhalis*; *Mycobacterium* spp.; *Fusobacterium* spp.; *Bordetella* spp.; *Chlamydia pneumoniae* e *Legionella* spp. (Abdelraouf A. Elmanama, 2007)

O modo de colheita das amostras para pesquisa de uma infeção do trato respiratório inferior depende do tipo de amostra a colher. Relativamente às amostras de expetoração, estas devem de ser obtidas por tosse profunda, tendo o cuidado de desprezar amostras que contenham saliva ou rinorreia para evitar contaminações. Deve ser colhida a primeira expetoração da manhã. (Fonseca, Sebastião e Cardoso, 2004) As amostras de lavado e aspirado brônquico, são obtidas por broncoscopia, um exame médico que permite a visualização interna do aparelho respiratório, nomeadamente dos brônquios, e a recolha de material para análise. (Fonseca, Sebastião e Cardoso, 2004) (Barroso, Campos e Grumete, 2007)

#### **a) Processamento**

### **Exame bacteriológico**

Estas amostras são semeadas em geloses COS e PVX e incubam em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 18 a 24 horas. São também elaborados esfregaços, posteriormente corados pela técnica de Gram para observação ao microscópio ótico.

## Exame micobacteriológico

As micobactérias, pertencentes ao género *Mycobacterium*, possuem uma parede celular complexa e rica em lípidos que lhes confere características que as destacam das demais bactérias, nomeadamente a resistência a ácidos, crescimento lento e antigenicidade. Para a sua observação ao microscópio ótico recorre-se a uma técnica de coloração específica para microrganismos ácido-álcool resistentes, a técnica de Kinyoun (procedimento em Anexo). (Brooks *et al.*, 2014) (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2014)

Deve proceder-se à homogeneização da amostra em questão que é, depois, semeada em meio Löwenstein-Jensen. A técnica de homogeneização tem como objetivo a descontaminação, fluidificação e concentração da amostra. As micobactérias são potencialmente fastidiosas e têm um crescimento lento, necessitando, portanto, de um meio com condições especiais para o seu exame cultural, sendo o meio de Löwestein-Jensen (LJ) mais frequentemente utilizado. (Soediono, 1989) (Silva, 2018)

As amostras assim semeadas incubam em condições de aerobiose, a 37°C durante 8 semanas, sendo que os tubos que contêm os meios inoculados devem permanecer inclinados segundo um ângulo de 45° durante o período de incubação. As amostras nestas condições são observadas com uma periodicidade mínima semanal.

São também efetuados esfregaços a partir das amostras homogeneizadas com o intuito de serem observadas ao microscópio após coloração por técnica de Kinyoun.

## Exame micológico

Procedimento idêntico ao descrito para as amostras de urina, fezes e exsudatos nasais.

### b) Interpretação de resultados

Relativamente à expetoração, é muito importante a avaliação da qualidade da amostra aquando da observação ao microscópio ótico de esfregaços corados pela técnica de Gram. Esta avaliação é efetuada através da contagem, em pequena ampliação (10x), do número médio de células epiteliais e leucócitos por campo, contagem esta posteriormente interpretada segundo os critérios de Murray & Washington, apresentados na Tabela iv.

**Tabela iv** - Critérios de Murray & Washington. Fonte: (Fonseca, Sebastião e Cardoso, 2004)

	Células epiteliais / Pequena ampliação (10 X)	Leucócitos / Pequena ampliação (10 X)
Grupo 1	25	10
Grupo 2	25	10-25
Grupo 3	25	25
Grupo 4	10-25	25
Grupo 5	< 10	25

São consideradas adequadas para exame bacteriológico, amostras que apresentem menos de 25 células epiteliais por campo em ampliação de 10x, ou seja, amostras incluídas nos grupos 4 ou 5, segundo os critérios apresentados. Amostras pertencentes aos grupos 3, 2 ou 1 são consideradas inadequadas devido à contaminação com secreções da orofaringe.

Para a pesquisa de micobactérias observam-se ao microscópio ótico esfregaços corados pela técnica de Kinyoun feitos diretamente do produto e após homogeneização, sendo que esta última técnica facilita a observação dos BAAR quando estes estão presentes em números baixos na amostra. Esta técnica de coloração utiliza a carbolfucsina, que confere coloração vermelha aos BAAR permitindo que se destaquem do fundo azul-esverdeado, que adquire a sua cor devido ao contracorante usado, neste caso, o verde-brilhante. A interpretação dos esfregaços analisados segundo esta técnica de coloração é feita de acordo com a Tabela v. (Fernández *et al.*, 2005) (Wildner *et al.*, 2011)

**Tabela v** - Interpretação de esfregaços, corados pela técnica de Kinyoun, para a pesquisa de BAAR.

<b>Número de BAAR observados</b>	<b>Interpretação</b>
0	Negativo
1 a 2/300 campos	Duvidoso (confirmar)
1-9/100 campos	1+
1-9/10 campos	2+
1-9/1 campo	3+
>9/1 campo	4+

Sementeiras em meio Löwenstein-Jensen que se apresentem positivas, ou seja, que demonstrem crescimento de colónias típicas, são sujeitas a um teste de Biologia Molecular para identificação e, caso esta se confirme, são repicadas para novo meio e enviadas para o CHUC realização do TSA. As colónias de *M. tuberculosis* têm aspeto de “couve-de-flor” e adquirem coloração amarelada em meio Löwenstein-Jensen. (Kayser *et al.*, 2005)

Em relação ao exame micológico, o crescimento de leveduras apenas é valorizado na ausência de crescimento bacteriano, enquanto que os fungos filamentosos podem estar presentes em associação com uma infeção bacteriana do aparelho respiratório. Fatores indutores de imunossupressão, tais como a quimioterapia e a presença de neoplasias, favorecem o desenvolvimento de infeção fúngica. A colonização do trato respiratório por parte do género *Candida* é comum em doentes sujeitos a ventilação mecânica, o que pode acontecer pela aspiração de microrganismos em colonização. (Vidigal e Svidzinski, 2009) Os fungos filamentosos mais frequentemente associados a infeções respiratórias do trato respiratório são: *Histoplasma capsulatum*; *Paracoccidioides brasiliensis*; *Sporothrix schenckii*; *Aspergillus* sp.; *Candida* sp.; *Cryptococcus neoformans* e Zigomicetes. (ANVISA, 2004) No caso

específico do IPO de Coimbra, os fungos filamentosos mais frequentemente associados a este tipo de infecção são *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus*. O crescimento em forma de fungo filamentoso ocorre pela produção de colónias filamentosas multicelulares que consistem em tubos cilíndricos ramificados denominados de hifas. (Brooks *et al.*, 2014) Nos casos em que se verifica crescimento de fungo filamentoso, o passo seguinte consiste na sua identificação pela observação microscópica das suas estruturas fúngicas (hifas, esporos...), com a objetiva de 10x e de 40x. Para a identificação de um fungo isolado é necessário avaliar a sua taxa de crescimento, a sua aparência macroscópica e a sua morfologia microscópica, sendo que o aspeto mais importante da sua morfologia a nível microscópico recai sobre a avaliação dos seus esporos reprodutores assexuados, nomeadamente, os conídios. A observação dos fungos filamentosos ao microscópio é efetuada pelo método da fita-cola, no qual se recorre a uma porção de fita-cola não contaminada e se pressiona cuidadosamente sobre o fungo em crescimento na placa que se quer observar. Neste procedimento deve colher-se uma zona do interior da colónia, evitando o seu centro, de modo a selecionar uma zona rica em estruturas reprodutoras e, simultaneamente, não escolhendo a zona mais antiga da colónia. Seguidamente, basta colar o pedaço de fita-cola numa lâmina para observação ao microscópio ótico. Estas lâminas são coradas com azul de lactofenol para que seja possível a visualização das estruturas fúngicas ao microscópio ótico. (Brooks *et al.*, 2014) (Yang, 2003) Meios que apresentem crescimento de mais que um fungo filamentoso são considerados prováveis contaminações. Este tipo de caso só deve ser valorizado quando o crescimento suspeito se verifica em ambas as placas de gelose SGC2 semeadas, ou quando, a pedido de nova amostra, esse mesmo crescimento se continua a verificar.

#### 2.4.2.5 Exsudados vaginais

Este tipo de amostra é analisado em laboratório com o intuito de averiguar a presença de uma infecção do trato genital feminino. As três causas mais frequentemente associadas ao aparecimento de infeções vaginais correspondem a casos de vaginose bacteriana, candidíase vulvovaginal e tricomoníase. (Ahmad e Ali, 2015)

O ecossistema vaginal é mantido através das relações estabelecidas entre a microbiota endógena e os seus produtos metabólicos, os níveis de estrogénio e o valor de pH. *Lactobacillus* spp. são responsáveis pela manutenção do pH vaginal normal (3,8-4,2) através da produção de ácido láctico, estabilizando assim o ecossistema vaginal e inibindo o crescimento de microrganismos anaeróbios facultativos e obrigatórios. O equilíbrio delicado

deste ecossistema pode ser destabilizado por fatores como alterações hormonais, toma de medicação, infecções e higiene pessoal. (Ahmad e Ali, 2015) (Bhat, Devi e Shenoy, 2013) (Fonseca, Sebastião e Cardoso, 2004)

Fazem parte da microbiota vaginal normal, para além de *Lactobacillus*, bactérias como: *Shaphylococcus* coagulase negativos; *Corynebacterium* spp. e *E. coli*. Os agentes patogénicos mais comunmente associados ao aparecimento de infeções do trato genital estão apresentados na Tabela vi. (Abdelraouf A. Elmanama, 2007)

**Tabela vi** - Os agentes etiológicos mais frequentemente associados a infeções do trato genital.  
Fonte: (Abdelraouf A. Elmanama, 2007)

<b>Agentes patogénicos associados a infeções do trato genital</b>	
Bactérias	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
	<i>Gardnerella vaginalis</i>
	Anaeróbios como <i>Actinomyces</i> spp.
	<i>Haemophilus ducreyi</i>
	<i>Enterococcus</i> spp.
	<i>Treponema pallidum</i>
	<i>Mycoplasma</i> spp.
	Enterobacteriaceae
	<i>Chlamydia trachomatis</i>
Fungos	<i>Candida albicans</i>
Parasitas	<i>Trichomonas vaginalis</i>

Os exsudados vaginais são colhidos com o auxílio de uma zaragatoa. Estas zaragatoas são colocadas em meio de Amies ou Stuart e devem ser mantidas a uma temperatura de 37°C até ao momento de análise para viabilizar a observação de parasitas com mobilidade (*Trichomonas vaginalis*). (Fonseca, Sebastião e Cardoso, 2004)

#### a) Processamento

##### **Exame bacteriológico**

As amostras são semeadas em gelose COS e PVX e são, seguidamente, incubadas em atmosfera de CO<sub>2</sub> à temperatura de 37°C. As placas são observadas e valorizadas após 18 a 24 horas de incubação. Efetuam-se também esfregaços a partir dos exsudados vaginais para posterior coloração por técnica de Gram e observação ao microscópio ótico.

Uma das bactérias que pode ser responsável por infeções do trato genital feminino é *Gardnerella vaginalis*. Para a deteção da presença desta bactéria, em caso de suspeita (pela presença de “clue cells” na análise por coloração de Gram), existe um teste laboratorial

específico, o teste de Whiff, o qual consiste em mergulhar a zaragatoa da amostra em questão numa solução de 10% hidróxido de potássio (KOH).

### **Exame micológico**

Procedimento idêntico ao descrito para as amostras anteriores, com exceção das hemoculturas. É ainda efetuado um exame direto a fresco com soro fisiológico para a pesquisa de leveduras.

### **Exame parasitológico**

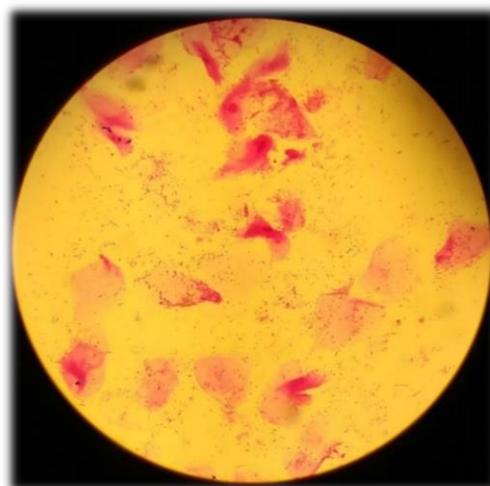
Para a pesquisa de parasitas neste tipo de amostras, é realizado um exame direto a fresco, com soro fisiológico, para a pesquisa de trofozoítos de *Trichomonas vaginalis*. A preparação é observada ao microscópio ótico, primeiro com uma ampliação de 10x e de seguida com uma maior ampliação, de 40x, com o condensador na posição mais baixa.

#### **b) Interpretação de resultados**

### **Exame bacteriológico**

Deve tomar-se atenção às características apresentadas pelas colónias em crescimento nas placas e à morfologia observada microscopicamente, de modo a determinar se são concordantes com as associadas a algum dos microrganismos responsável por este tipo de infeção. Caso tal associação se verifique, procede-se à realização de um teste de identificação e TSA.

*Gardnerella vaginalis* é uma bactéria anaeróbia facultativa, imóvel e, relativamente à sua morfologia, apresenta-se sob a forma de cocobacilos Gram-variável. Esta bactéria é fastidiosa, o que se traduz na necessidade de meios ricos para o seu crescimento. Uma característica de infeção por *Gardnerella vaginalis* é a observação microscópica de “clue-cells”, representadas na Figura 6, que consistem em células epiteliais cuja superfície se encontra coberta por estes microrganismos. Esta adesão por parte das bactérias permite-lhes colonizar a mucosa vaginal e, simultaneamente, minimizar o seu contacto com enzimas



**Figura 6** - Observação microscópica de “clue-cells” associada a um caso de infeção vaginal por *Gardnerella vaginalis*.  
Fonte: Setor de Microbiologia do IPO de Coimbra

extracelulares e anticorpos locais, o que permite evitar a sua eliminação através da urina ou do fluido vaginal. (Silveira, Souza e Albini, 2010)

Relativamente ao teste de Whiff para a pesquisa de *Gardnerella vaginalis*, a sua interpretação positiva consiste na libertação, após breves minutos de tempo de espera, de um odor característico, a “peixe podre”, originado pela produção de aminas. (Vespero et al., 1999)

### **Exame micológico**

*Candida albicans* é o fungo mais associado a este tipo de infeções e, portanto, a sua pesquisa é o principal objetivo do exame micológico de amostras vaginais. Relativamente à observação microscópica, podem ser observadas leveduras em gemulação, de forma oval, é também frequente o aparecimento de pseudo-hifas. As colónias de *Candida albicans* têm aspeto arredondado e esbranquiçado e podem ser diferenciadas de outras leveduras através das suas características morfológicas e bioquímicas. (Kayser et al., 2005)

Caso as características obtidas no exame sejam concordantes com as acima descritas, o resultado pode ser confirmado pela realização de um teste de ID ou ainda pelo teste do tubo germinativo, específico para a pesquisa de *Candida albicans*.

### **Exame parasitológico**

O parasita *Trichomonas vaginalis* é um protozoário flagelado e microaerofílico e a sua transmissão interpessoal ocorre, sobretudo, por contacto sexual. O seu diagnóstico laboratorial passa pela observação microscópica direta dos trofozoítos, que deve ser efetuada o mais rapidamente possível, uma vez que estes microrganismos só apresentam mobilidade por cerca de 10 minutos após colheita. Estes trofozoítos podem ser reconhecidos pelo seu movimento e formato característico e pelo seu tamanho, aproximado ao apresentado pelos leucócitos. (Despommier et al., 2017) (Kayser et al., 2005)

#### **2.4.2.6 Exsudados purulentos**

São muitas as situações clínicas e os agentes etiológicos responsáveis pelo aparecimento de infeções localizadas que originam a formação de exsudados purulentos, cujo aparecimento surge em consequência de infeções da pele ou tecidos moles. Alguns dos agentes etiológicos associados a este tipo de infeção são: *Streptococcus* spp.  $\beta$ -hemolítico; *Streptococcus pyogenes*; *Staphylococcus* spp. coagulase negativo, especialmente associado ao

uso de cateteres; *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Enterococcus* spp.; *Enterobacteriaceae*. (Fonseca, Sebastião e Cardoso, 2004) (Dryden, 2010)

Devido às variáveis envolvidas neste tipo de situação, a metodologia para análise destas amostras necessita de ter em consideração fatores como: o local da infecção, a história clínica do doente, o tipo de infecção (associada ou não à presença de abscessos) e o modo de colheita. (Fonseca, Sebastião e Cardoso, 2004)

As colheitas de exsudados de lesões profundas, ou fechadas, devem ser realizadas por punção e aspiração com agulha e seringa. Os exsudados purulentos provenientes de lesões abertas devem ser colhidos em zaragatoa, que por sua vez, deve ser colocada em meio de Amies ou Stuart. (Fonseca, Sebastião e Cardoso, 2004)

Não é possível a pesquisa de microrganismos anaeróbios em amostras enviadas ao laboratório com exposição ao ar. Esta pesquisa é possível apenas nas amostras que chegam ao setor em seringa devidamente tapada.

#### a) Processamento

##### **Exame bacteriológico**

As amostras enviadas ao laboratório em zaragatoa são semeadas em gelose COS e PVX e, posteriormente, incubam a 37°C durante um período de 18 a 24 horas.

Caso a amostra seja destinada à pesquisa de microrganismos anaeróbios, esta é semeada em gelose SCS e incubada em condições de anaerobiose, obtidas pela utilização do sistema GENbag, e aerobiose, a 37°C durante 48 horas. O restante produto biológico é colocado em meio líquido específico para a recuperação de anaeróbios, o caldo Schaedler com vitamina K3 (KCS). É também efetuado, a partir da amostra, um esfregaço para posterior coloração por técnica de Gram e observação ao microscópio.

Após terminado o período de incubação, as placas são observadas e valorizadas. No caso das amostras para pesquisa de anaeróbios, o caldo de Schaedler é repicado para uma gelose SCS para incubação em anaerobiose e para uma placa com meio COS para controlo.

É também efetuado um esfregaço a partir deste mesmo caldo que, posteriormente, é submetido a uma coloração pela técnica de Gram para observação microscópica.

##### **Exame micológico**

Processo idêntico ao realizado para as amostras anteriores, com exceção das hemoculturas.

## b) Interpretação de resultados

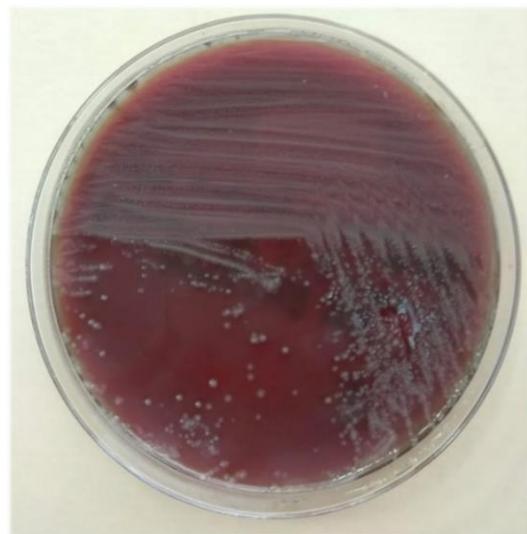
As amostras para pesquisa de anaeróbios são também inoculadas em meio para crescimento de aeróbios como forma de controlo, uma vez que microrganismos que demonstrem crescimento em meios com condições aeróbias não podem ser considerados verdadeiros anaeróbios.

A bactéria *Staphylococcus aureus* e os microrganismos pertencentes ao grupo de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos do grupo A (*Streptococcus pyogenes*) correspondem aos agentes etiológicos mais frequentemente associados ao aparecimento de infeções da pele e tecidos moles. (Dryden, 2010)

No caso específico de exsudados purulentos originários de feridas operatórias, é importante o laboratório ser informado da sua zona de proveniência, isto porque a valorização dos resultados depende da localização da ferida e da microbiota associada.

Doentes imunocomprometidos como, por exemplo, aqueles submetidos a quimioterapia e a transplante de órgãos, podem desenvolver celulite, uma infeção que envolve a pele e os tecidos subcutâneos, devido à propagação por via hematogénica de microrganismos como *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia*, entre outras bactérias, fungos, e até mesmo microrganismos mais atípicos como é o caso de alguns bacilos Gram-negativo (*Pseudomonas* spp.; *Proteus* spp. (Figura 7); *Serratia* spp.; *Enterobacter* spp.; *Citrobacter* spp.) e microrganismos anaeróbios. (Esposito et al., 2017)

Assim sendo, devem ser considerados os vários fatores anteriormente mencionados na interpretação dos resultados obtidos. O aparecimento de um crescimento suspeito ao nível das placas semeadas, ou uma observação microscópica suspeita devem então, como em todos os outros casos, ser confirmados com um teste de ID e um TSA.



**Figura 7** - Placa de meio PVX semeado a partir de uma amostra de exsudado purulento superficial, com evidência de crescimento de *Proteus* spp. Pode observar-se a presença de um padrão de crescimento característico desta espécie denominado de swarming.  
Fonte: Setor de Microbiologia do IPO de Coimbra

#### 2.4.2.7 Ponta de cateter

Os cateteres intravasculares correspondem aos dispositivos hospitalares invasivos mais utilizados mundialmente. O uso prolongado de cateteres representa uma potencial fonte de complicações infecciosas, podendo originar quer infeções a nível local devido à colonização do cateter, quer episódios de infeção sistémica. (Marques, Ferreira e Carneiro, 2011) São as bactérias e os fungos os principais agentes etiológicos responsáveis por este tipo de infeção. Embora a bactéria *Staphylococcus* spp. seja o agente etiológico mais associado a este tipo de caso, outros microrganismos tais como bacilos Gram-negativo, *Candida* spp. e *Enterococcus* spp., demonstram uma importante participação em infeções associadas ao uso de cateteres. (Marques, Ferreira e Carneiro, 2011)

Para esta análise é necessária a recolha de 5 centímetros da parte distal do cateter, que é posteriormente colocada em frasco estéril e enviada até ao laboratório. Este transporte deve ser efetuado o mais rapidamente possível de modo a evitar uma secagem excessiva.

##### a) Processamento

Os exames laboratoriais bacteriológicos e micológicos de amostras de ponta de cateter têm por base a realização de uma cultura semi-quantitativa da amostra em questão pelo método de Maki. Este tipo de cultura é importante na medida em que permite determinar a relação entre a colonização do cateter e a existência de uma infeção. O método de Maki para cultura semi-quantitativa consiste na cultura, em gelose apropriada, da superfície externa da ponta de cateter. (Bouza, Liñares e Pascual, 2004)

#### **Exame bacteriológico**

A ponta de cateter é rodada, com o auxílio de uma pinça previamente esterilizada, algumas vezes sobre a placa com meio COS, de acordo com a técnica semi-quantitativa de Maki. Quando a ponta de cateter que chega ao laboratório é maior que 5 cm, deve semear-se a superfície interna do cateter, o que pode ser conseguido pela injeção no mesmo de uma solução de 1 mL de soro fisiológico estéril, posteriormente semeada em meio apropriado; ou ao colocar a ponta de cateter em caldo cérebro-coração (BHI) para incubação. O meio BHI é um caldo de enriquecimento destinado à cultura de microrganismos não anaeróbios. A sua constituição nutritiva promove, tal como o meio COS, o crescimento de um leque muito vasto de microrganismos, o que justifica a sua utilização para o auxílio no diagnóstico de

infecções que têm associadas uma grande variedade de possíveis agentes etiológicos. Nestes casos, em que o tamanho da ponta de cateter é desadequado, a superfície externa pode também ser semeada segundo a técnica de Maki. O volume conhecido de soro fisiológico injetado no cateter, nestas condições, necessita de ser semeado em meio sólido. Como este se trata de um produto líquido, é efetuada a técnica de sementeira por inundação, na qual se espalha a totalidade do volume do produto obtido sobre toda a superfície do meio de cultura.

Após 18 a 24 horas de incubação, a 37°C, as placas são observadas e valorizadas.

### **Exame micológico**

A ponta de cateter é semeada, de forma idêntica, em gelose SGC2. As placas assim semeadas são posteriormente incubadas em condições de aerobiose e a 37°C durante 18 a 24 horas. Relativamente aos casos em que a porção de cateter enviada é maior que o recomendado, o procedimento a tomar é igual ao descrito no tópico referente ao exame bacteriológico.

#### **b) Interpretação de resultados**

Segundo o método semi-quantitativo de Maki, o estado de contaminação do cateter em análise é considerado positivo quando o crescimento por placa é  $\geq 15$  UFC. Se o crescimento verificado for  $< 15$  UFC, o cateter considera-se apenas colonizado por contaminação posterior. (Bouza, Liñares e Pascual, 2004) A quantidade de colónias que se desenvolve nas placas semeadas depende do tamanho da porção de cateter utilizada, o que significa que é muito importante respeitar os cinco centímetros recomendados, de modo a evitar que os resultados obtidos sejam falsamente interpretados.

Relativamente à utilização do caldo BHI para cultura da amostra, a presença de turvação indica a presença de microrganismos em quantidade suficiente para se considerar a amostra positiva, o que não invalida a sua repicagem para meio sólido e posterior identificação e TSA.

### 2.4.3 Identificação de microrganismos e Teste de suscetibilidade a antibióticos

O teste de suscetibilidade a antimicrobianos deve ser realizado a qualquer microrganismo que seja responsável por um processo infeccioso que necessite de ser combatido através de terapia antibiótica. Este tipo de teste é especialmente aconselhado para os microrganismos pertencentes a espécies associadas a resistências aos antimicrobianos mais frequentemente administrados. (Fonseca, Sebastião e Cardoso, 2004)

No Setor de Microbiologia do IPO de Coimbra, os testes de identificação e de suscetibilidade a antimicrobianos são efetuados num sistema automatizado, o Vitek® 2. Apesar de estes serem testes automáticos, a sua realização depende da orientação conseguida pela realização de vários dos testes manuais, alguns deles referidos anteriormente neste capítulo. Estes testes permitem determinar características morfológicas e bioquímicas dos microrganismos em estudo, contribuindo assim para o desenrolar do seu processo de identificação. Assim sendo, a observação das características das colónias, nomeadamente, a sua forma, odor, cor e capacidade de realizar hemólise, assim como a utilização de meios de crescimento seletivos e a realização de testes manuais de suscetibilidade a antibióticos e bioquímicos como o da catalase, urease, oxidase e coagulase, permitem direcionar, em contexto laboratorial, qual o procedimento a seguir para a realização dos testes de ID e TSA. (Pereira e Petrechen, 2011)

#### **Testes manuais de suscetibilidade a antibióticos**

##### Teste de suscetibilidade à Optoquina

Este teste consiste na aplicação de um disco de optoquina no centro de uma placa de gelose de sangue posteriormente semeada pela técnica de sementeira em toalha a partir de uma suspensão de 0,5 McFarland com origem em colónias do microrganismo. Estas placas são posteriormente incubadas a 35°C e em atmosfera de CO<sub>2</sub> durante um período de 18 a 24 horas. A realização deste teste permite a identificação presuntiva de *Streptococcus pneumoniae*, isto porque, contrariamente às restantes espécies de *Streptococcus* e aos restantes microrganismos pertencentes à microbiota do trato respiratório, este é inibido pela optoquina. O crescimento de *S. pneumoniae* é então caracteristicamente inibido por este antibiótico, originando um halo de inibição  $\geq 19$  milímetros. (Fonseca, Sebastião e Cardoso, 2004)

## Teste de Identificação pelo sistema Vitek® 2

Para a identificação de determinado microrganismo é escolhida, consoante as características anteriormente determinadas, uma das cartas para identificação automática, sendo que estas cartas têm especificidade para um dado grupo de microrganismos. Sabendo qual a carta a aplicar, procede-se à elaboração de uma suspensão, obtida com o auxílio de uma zaragatoa a partir das colónias do microrganismo a identificar. Esta suspensão tem como base 3 mL de solução salina, na qual é descarregada a zaragatoa com os microrganismos obtidos a partir das colónias em questão. A densidade desta suspensão é determinada com o auxílio de um densitómetro e depende da carta que se tenciona usar, tal como descrito na Tabela vii. As densidades estabelecidas respeitam a escala de McFarland, que permite associar o grau de turvação de uma solução à concentração bacteriana presente na mesma.

**Tabela vii** - Associação entre as cartas de identificação utilizadas pelo sistema Vitek®2, os grupos de microrganismos que permitem identificar e as densidades, em escala McFarland, das suspensões associadas.

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

A partir da suspensão anteriormente preparada, obtém-se a destinada à realização do TSA. As cartas utilizadas para os testes de TSA e a sua associação ao grupo de microrganismos a que se destinam estão apresentadas na Tabela viii. Não existem TSA automatizados destinados aos microrganismos inseridos nos grupos ANC e NH.

**Tabela viii** - Cartas de TSA utilizadas no Setor de Microbiologia e sua associação aos grupos de microrganismos a que se destinam.

Carta de TSA	Microrganismo
355	<i>Enterobacteriaceae</i>
373	<i>Pseudomonaceae</i>
648	<i>Shaphylococcus</i> sp.
586	<i>Sreptococcus</i> sp. (hemólise não $\alpha$ ) <i>Enterococcus</i> sp.
ST-03	<i>Sreptococcus</i> sp. ( $\alpha$ -hemólise)
YS08	Leveduras

É muito importante a confirmação de que a suspensão foi obtida a partir de uma cultura pura pois, caso contrário, podem surgir erros nos resultados devido à soma de resistências dos múltiplos microrganismos. Para tal, é feito o chamado controlo ID, conseguido pela cultura de uma gota da suspensão final em meio de crescimento, que deve ser do mesmo tipo que o meio de origem.

Após esta preparação inicial, podem ser aplicadas as cartas à cassette com as suspensões anteriormente preparadas, e esta mesma cassette fica assim pronta a ser introduzida no equipamento que, automaticamente, procede à inoculação das cartas.

O sistema Vitek<sup>®</sup> 2 permite então a identificação dos microrganismos, informando acerca do seu género e espécie, e a obtenção dos seus perfis de suscetibilidade em relação aos antimicrobianos analisados. A identificação atribuída a cada microrganismo é sempre acompanhada por um valor em percentagem que representa a confiança associada ao resultado obtido.

Os testes de suscetibilidade a antimicrobianos podem ainda ser realizados pelo método de difusão em disco de Kirby-Bauer. Este método permite avaliar a resposta *in vitro* de uma dada bactéria à presença de um disco estandardizado impregnado com determinado antibiótico. Esta resposta tem uma correlação com a desenvolvida *in vivo* pela administração dessa mesma terapêutica. Para a realização do teste de suscetibilidade por este mesmo método recorre-se à técnica de sementeira em toalha para inocular placas de gelose Mueller-Hinton (MH), um meio usado principalmente para o estudo da suscetibilidade a antimicrobianos. Pode também ser utilizada a gelose Mueller-Hinton Fastidious (MH-F), específica para microrganismos fastidiosos, que possui uma composição um pouco diferente, com 5% de sangue de cavalo. (Abdelraouf A. Elmanama, 2007) (Fonseca, Sebastião e Cardoso, 2004)

As placas de MH ou MH-F devem ser inoculadas com uma suspensão de 0,5 McFarland com origem em colónias vindas de meio não seletivo e com menos de 24 horas de incubação. Não devem ser aplicados mais de 5 discos (90 mm de diâmetro) de antibiótico por placa e estas devem ser incubadas até 15 minutos após a aplicação dos mesmos, a 35°C e durante um período de 16 a 20 horas, sendo que as condições de anaerobiose ou aerobiose dependem do microrganismo em estudo. A interpretação dos halos de inibição resultantes permite classificar o microrganismo como resistente ou suscetível aos antibióticos aplicados, sendo que esta interpretação é feita de acordo com as regras EUCAST. (EUCAST, 2019)

O método de difusão em disco pode também ser utilizado para a pesquisa de enzimas bacterianas que conferem resistência a antibióticos, como é o caso do teste de atividade das carbapenemases (CAT) e das  $\beta$ -lactamases de largo espectro (ESBL).

#### 2.4.4 Biologia Molecular

Os testes de Biologia Molecular são realizados no equipamento GeneXpert<sup>®</sup>, por meio do qual são efetuados ensaios de PCR em tempo real. A PCR consiste num processo bioquímico que permite a elaboração de cópias e a amplificação de porções da molécula de DNA recorrendo a uma DNA polimerase termicamente estável. (Loftis e Reeves, 2012) Este é um teste específico e sensível e, portanto, ideal para uma pesquisa célere e fidedigna de determinados microrganismos, assim como de genes a eles associados que lhes confirmam resistências à terapia antibiótica ou uma maior virulência. (Loftis e Reeves, 2012)

Foram vários os testes de PCR em tempo real efetuados no setor de microbiologia:

Carbapenemases: Teste para deteção rápida e diferenciação das carbapenemases OXA-48, VIM, KPC, NDM e IMP-I. As carbapenemases são enzimas com a capacidade de hidrolisar os carbapenemos, uma subclasse de antibióticos pertencente aos  $\beta$ -lactâmicos. (Nodari e Barth, 2016) (Ivanova, 2014)

Staphylococcus aureus resistente à meticilina: Teste para a deteção urgente, em amostras nasais, de MRSA. A bactéria *S. aureus* apresenta uma enorme capacidade de adaptação, o que está na origem da sua resistência a antibióticos. Este facto colocou *S. aureus* entre as espécies de maior relevância nas infeções nosocomiais. A resistência deste microrganismo à meticilina é consequência da aquisição do gene *mecA*, um gene codificador de enzimas denominadas proteínas de ligação à penicilina (PBPs) alteradas. As PBPs alteradas possuem uma afinidade reduzida para com os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, como é o caso da meticilina. (Lima *et al.*, 2015)

*S. aureus* e MRSA em hemoculturas: Teste para a deteção urgente e simultânea de *S. aureus* e MRSA em hemoculturas positivas. A bactéria *S. aureus* corresponde a uma das principais causas de bacteriemia, com elevados níveis de morbilidade e mortalidade associados. As complicações consequentes dos casos de bacteriemia aumentam com a duração do tempo até ao tratamento e, portanto, métodos que permitam a identificação célere deste microrganismo em hemoculturas, como é o caso da PCR, são de grande importância. (Qian, Eichelberger e Kirby, 2007)

*Mycobacterium tuberculosis* – Teste para a detecção urgente do complexo *M. tuberculosis* e mutações do gene *rpoB* associadas à resistência à rifamicina. Para este teste utilizam-se amostras de expectoração sem tratamento prévio. A resistência à rifamicina por parte desta bactéria é uma consequência da ocorrência de mudanças estruturais na enzima RNA polimerase, produto de expressão do gene *rpoB*. Esta resistência requer uma grande atenção porque pode consistir num marcador para multirresistência a fármacos e está associada a baixas perspectivas no que toca ao tratamento de doentes com esta estirpe. Assim sendo, é de grande importância a utilização da técnica de PCR para a sua pesquisa, um método de baixo custo e que permite uma redução no tempo de diagnóstico. (Carvalho et al., 2007)

## 2.5 Setor de Hematologia

No setor de hematologia procede-se à análise de amostras de sangue com o intuito de averiguar a presença de patologias hematológicas. Os exames efetuados baseiam-se no estudo das células e componentes sanguíneos e permitem a classificação das patologias identificadas. Na Tabela ix estão apresentados os equipamentos presentes no Setor de Hematologia e as respetivas funcionalidades.

**Tabela ix** - Principais equipamentos do Setor de Hematologia e respetivas funcionalidades.

<b>Equipamento</b>	<b>Funcionalidade</b>
Coulter LH 750 Analyzer (Beckman Coulter)	Hemogramas
Test I BCL (ALI FAX)	Velocidade de sedimentação
ACL TOP® CTS 500 (Instrumentation Laboratory)	Testes de coagulação
Aerospray® 7150 Hematology Slide Stainer Centrifuge (WESCOR)	Coloração de esfregaços sanguíneos
Cytomics FC500 (Beckman Coulter)	Imunofenotipagem por Citometria de fluxo

### 2.5.1 Hematologia

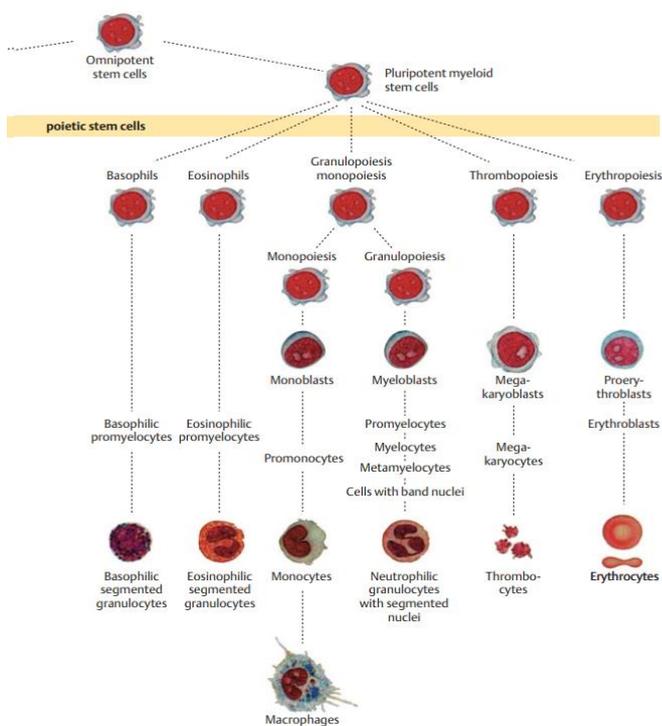
A Hematologia corresponde ao ramo da medicina que se dedica ao estudo do sangue, dos órgãos envolvidos na sua formação e das patologias associadas. (Mandal, 2019)

O diagnóstico quantitativo e qualitativo com base na análise dos componentes celulares sanguíneos é de grande importância uma vez que permite, com facilidade de acesso,

a pesquisa de indicadores patológicos presentes nos órgãos produtores das células sanguíneas que, contrariamente, são de difícil acesso.

## Hematopoiese

O processo de formação das células sanguíneas denomina-se de hematopoiese e encontra-se representado na Figura 8. Este processo origina as várias linhas celulares, nomeadamente, os eritrócitos (eritropoiese), granulócitos e monócitos (mielopoiese) e plaquetas (trombopoiese). O processo hematopoiético é iniciado por uma célula estaminal pluripotente que tem a capacidade de se dividir



**Figura 8** - Esquema representativo do processo de hematopoiese.

Fonte: (Theml, Diem e Haferlach, 2004)

assimetricamente, de modo a originar células das diferentes linhagens. Nos adultos, é unicamente a medula óssea que possui a capacidade de produzir novas células sanguíneas e a secção hematopoiética medular é confinada à parte central do esqueleto e aos extremos proximais do fémur e úmero, devido à ocupação gradual da mesma por adipócitos. (Hoffbrand e Moss, 2016) (Hamid, 2011) Os processos de proliferação e diferenciação celulares ao nível da medula óssea são controlados por fatores de crescimento hematopoiéticos, que são hormonas glicoproteicas, produzidas essencialmente pelas células estromais, com a exceção da eritropoietina, 90% da qual é sintetizada pelo rim, e da trombopoietina, maioritariamente formada no fígado. (Hamid, 2011) (Hoffbrand e Moss, 2016)

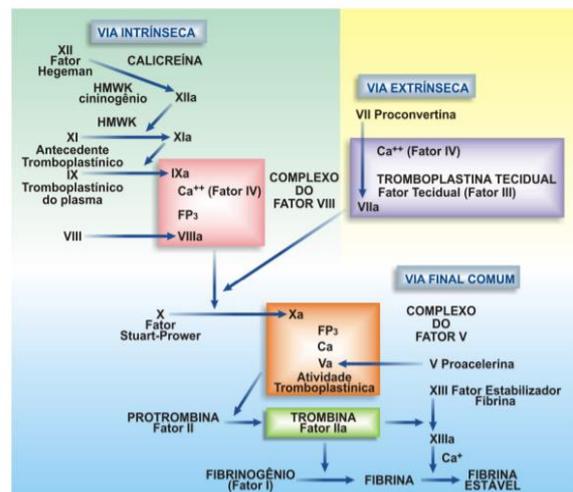
## Hemostase

O fenómeno da hemostase, representado esquematicamente pela Figura 9, é um processo complexo que depende de interações entre as paredes dos vasos, as plaquetas, os fatores de coagulação e o sistema fibrinolítico. Este processo é desencadeado pela exposição de colagénio que ocorre em casos de lesão nos vasos sanguíneos. (Hamid, 2011)

Imediatamente após a lesão vascular, ocorre vasoconstrição local com consequente redução do fluxo sanguíneo, o que permite a ativação das plaquetas e dos fatores de coagulação. Uma vez ativadas, as plaquetas aderem ao tecido conetivo exposto, sendo que esta adesão é mediada pelo fator von Willebrand (FvW). Plaquetas que se encontrem em circulação são atraídas para a zona lesada levando a uma agregação contínua que promove o crescimento do trombo hemostático. (Hoffbrand e Moss, 2016)

A formação do coágulo só é conseguida quando a fibrina é adicionada ao trombo inicialmente formado. Após lesão vascular ocorre também de imediato a formação da Xase extrínseca, constituída pelo fator VIIa, fator tecidual (TF), fosfolípidos e  $Ca^{2+}$ , que dá início à cascata da coagulação. A Xase intrínseca, entretanto, leva à formação de trombina que, por sua vez, converte o fibrinogénio plasmático em fibrina, além de que ativa os fatores XI e XIII e os cofatores V e VIII. Enquanto a via extrínseca é ativada pelo dano tecidual, a intrínseca fica ativa pelo contacto do sangue com uma superfície diferente do endotélio normal e das células sanguíneas. (Hoffbrand e Moss, 2016) (Carlos e Freitas, 2007)

A fibrinólise, tal como a coagulação, é uma resposta hemostática natural à lesão vascular. O plasminogénio, uma enzima presente no sangue, é convertido a plasmina por ação de componentes quer com origem na parede vascular (ativação intrínseca), quer por componentes tecidulares (ativação extrínseca). A formação de plasmina no local lesado permite limitar a extensão do trombo, graças à sua capacidade de digerir o fibrinogénio, a fibrina, os fatores V e VIII e muitas outras proteínas. Os produtos desta degradação podem ser pesquisados analiticamente e são de interesse clínico. (Hoffbrand e Moss, 2016).



**Figura 9** - Representação do modelo clássico da coagulação sanguínea.  
Fonte: (RODRIGUES, 2012)

## 2.5.2 Produtos biológicos

O sangue total é o produto biológico que chega ao Setor de Hematologia. Para a realização dos testes relativos à coagulação sanguínea, o sangue é centrifugado (3000 r.p.m., 10 minutos) de maneira a obter plasma, produto sobre o qual são realizados esses mesmos testes.

Os tubos para a colheita de sangue destinados a exames de coagulação e aqueles destinados à realização de hemograma e determinação de velocidade de sedimentação (VS) apresentam diferenças. Estes dois tipos de tubos distinguem-se visualmente pela cor da sua tampa (azul para testes de coagulação e roxo para hemogramas e VS) e, para além disto, contêm anticoagulantes distintos. Os tubos de tampa azul têm como anticoagulante o citrato de sódio, numa proporção de anticoagulante/amostra fixa, de 1:9, enquanto os de tampa roxa utilizam EDTA.

As amostras para hemograma permanecem em constante agitação até ao momento de entrada no equipamento, isto para evitar a ocorrência de erros nas determinações, neste caso causadas por uma má leitura devido ao processo de sedimentação.

### 2.5.3 Hemograma

O hemograma consiste num exame laboratorial que permite a quantificação e a avaliação morfológica das células presentes em circulação no sangue periférico. Este tipo de exame é realizado, em laboratório, por aparelhos automatizados que oferecem sensibilidade, celeridade e precisão na obtenção de resultados. (Bandeira, Magalhães e Aquino, 2014)

Esta análise é de grande importância na medida em que é um grande auxílio no diagnóstico de patologias hematológicas, e é ainda realizado nos exames periódicos como monitorização do estado de saúde. (Rosenfeld, 2012)

#### 2.5.3.1 Metodologia

No Setor de Hematologia, os hemogramas são realizados no equipamento automatizado Beckman Coulter LH 750<sup>®</sup>. Este equipamento utiliza o princípio de impedância ou princípio de Coulter e a tecnologia VCS (**V**olume, **C**onductivity, light **S**catter) para a quantificação das várias populações celulares. (Xu, 2015)

O princípio de Coulter recorre à condutância para a contagem de células sanguíneas em suspensão. Este princípio baseia-se no facto de que a condutividade das células é inferior quando comparada com a da solução salina utilizada como meio de suspensão. A suspensão celular é forçada a passar através de um pequeno orifício, sendo que em cada um dos lados do mesmo se encontra um eléctrodo. Ambos os eléctrodos estabelecem entre si uma corrente constante. Aquando da passagem de uma célula pelo orifício há um aumento na resistência o que origina um pico na diferença de potencial eléctrico entre os eléctrodos. Após a passagem das células, os pulsos são amplificados e contados. (Curtis *et al.*, 2008)

A **contagem leucocitária** é então feita com base no princípio de Coulter. Estes resultados são obtidos pela contagem do número de pulsos registados por um osciloscópio que são traduzidos num gráfico cujo eixo das abcissas representa o número de partículas com um determinado tamanho, e o eixo das ordenadas, os possíveis tamanhos das partículas analisadas. Assim se obtém um histograma de leucócitos, em função do tamanho do seu núcleo.

Uma vez realizada a contagem leucocitária, a amostra passa à câmara destinada à **quantificação de hemoglobina**. Nesta fase, uma luz de 525 nm incide sobre a solução e é medida a transmitância da mesma. É gerada uma corrente elétrica de voltagem inversamente proporcional à quantidade de hemoglobina presente.

As **contagens eritrocitárias e plaquetárias** são também realizadas segundo o princípio de Coulter. Para fazer a diferenciação entre estes dois tipos de células, o equipamento utiliza como referência dois intervalos de tamanho: entre 2-20 fL as células são contabilizadas como plaquetas, enquanto entre 36-360 fL, são consideradas eritrócitos.

Os pulsos obtidos são traduzidos em dois histogramas, um referente aos glóbulos vermelhos e outro às plaquetas. Relativamente aos eritrócitos, o histograma fornece informação acerca do número de células (RBC), volume médio das mesmas (MCV) e da ampliação da distribuição em termos de volume celular (RDW). A partir destes parâmetros o equipamento tem a capacidade de calcular os restantes, nomeadamente, o hematócrito (Hto), a hemoglobina corpuscular média (MCH) e a concentração corpuscular média de hemoglobina (MCHC). O histograma plaquetar fornece informação relativamente ao número de plaquetas (PLT); volume plaquetar médio (MPV) e à amplitude de distribuição plaquetária (PDW) e, por cálculo, fornece também o valor do plaquetócrito (PCT).

Para a determinação da **fórmula leucocitária**, a amostra passa à célula de fluxo onde serão determinados os parâmetros de volume, condutividade e dispersão de laser. A determinação destes mesmos parâmetros permitirá identificar cada tipo de leucócito. O equipamento obtém os resultados da quantificação de cada população celular em percentagem, a partir dos quais calcula os valores absolutos. Os valores de volume, condutividade e dispersão são traduzidos num gráfico tridimensional, obtendo-se assim o diagrama de dispersão da amostra.

A **quantificação de reticulócitos** é efetuada numa outra câmara específica, em que é adicionado um reagente que tinge o RNA dos reticulócitos. Os valores de volume, condutividade e dispersão são obtidos e traduzidos num diagrama de dispersão de

reticulócitos da amostra. O aparelho obtém de forma direta os valores de percentagem de reticulócitos (%RET), e, através de cálculo, o seu valor absoluto (#RET).

### 2.5.3.2 Parâmetros determinados e esfregaço de sangue periférico

#### Leucograma

Esta análise permite quantificar a totalidade de leucócitos presentes numa amostra de sangue total, bem como subpopulações leucocitárias, apresentando o resultado quer em forma de percentagem quer em valor absoluto. Os leucócitos podem ser divididos em dois grandes grupos: fagócitos e linfócitos. Os fagócitos englobam as células que participam na resposta imunitária inata, enquanto os linfócitos são mediadores da resposta imune adaptativa. Por sua vez, os fagócitos podem ainda ser subdivididos em granulócitos e monócitos, sendo que dentro do grupo dos granulócitos estão incluídos os neutrófilos, eosinófilos e basófilos. (Hoffbrand e Moss, 2016)

Os parâmetros determinados por esta análise estão apresentados na Tabela x.

Para além das populações leucocitárias, o leucograma informa acerca da presença de blastos. Os blastos são células imaturas com origem na medula óssea, cuja proliferação e presença no sangue periférico podem alertar para situações patológicas e auxiliar na sua classificação e diagnóstico. (Hamid, 2011)

**Tabela x** - Parâmetros determinados pelo leucograma.

<b>WBC (<math>\times 10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	Valor absoluto de leucócitos		
<b>NE (<math>\times 10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	Valor absoluto de neutrófilos	<b>NE (%)</b>	Valor percentual de neutrófilos
<b>LY (<math>\times 10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	Valor absoluto de linfócitos	<b>LY (%)</b>	Valor percentual de linfócitos
<b>MO (<math>\times 10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	Valor absoluto de monócitos	<b>MO (%)</b>	Valor percentual de monócitos
<b>EO (<math>\times 10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	Valor absoluto de eosinófilos	<b>EO (%)</b>	Valor percentual de eosinófilos
<b>BA (<math>\times 10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	Valor absoluto de basófilos	<b>BA (%)</b>	Valor percentual de basófilos
<b>NRBC (<math>\times 10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	Valor absoluto de blastos	<b>NRBC (%)</b>	Valor percentual de blastos

#### Eritrograma

O eritrograma deve incluir a contagem dos eritrócitos, a dosagem de Hemoglobina, a determinação do hematócrito (razão entre o volume de eritrócitos e o volume sanguíneo total) e os índices hematimétricos (MCV, MCH, MCHC). (Naoum e Naoum, 2008) (Theml, Diem e Haferlach, 2004)

Os eritrócitos são células em forma de disco bicôncavo cuja função consiste no transporte de oxigênio e de dióxido de carbono. O transporte de oxigênio é efetuado pela hemoglobina, uma proteína constituída por quatro grupos heme, cada um com um íão de ferro que se pode ligar reversivelmente a uma molécula de oxigênio. (VanPutte, Regan e Russo, 2016) A análise qualitativa dos eritrócitos é caracterizada pelo MCV, MCH e MCHC. A dispersão do volume eritrocitário depende da existência de várias populações de eritrócitos com volumes discrepantes. (Theml, Diem e Haferlach, 2004) Os parâmetros determinados pelo eritrograma estão apresentados na Tabela xi.

**Tabela xi** - Parâmetros determinados pelo eritrograma.

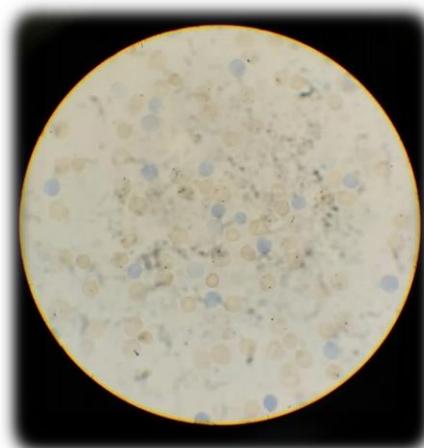
<b>RBC (<math>\times 10^6/\mu\text{L}</math>)</b>	Valor absoluto de eritrócitos
<b>HGB (g/dL)</b>	Concentração da totalidade de Hemoglobina no sangue
<b>HCT (%)</b>	Hematócrito
<b>MCV (fL)</b>	Volume corpuscular médio
<b>MCH (pg)</b>	Hemoglobina corpuscular média
<b>MCHC (g/dL)</b>	Concentração média de Hemoglobina corpuscular
<b>RDW (%)</b>	Dispersão do volume eritrocitário

### Reticulócitos

Este parâmetro não faz parte da rotina e é apenas determinado nas situações em que é pedido pelo clínico requisitante.

Os reticulócitos representam o primeiro estágio anucleado no processo de diferenciação do eritrócito. (Hamid, 2008) A presença destas células no sangue periférico indica um aumento na celeridade da produção eritrocitária na medula óssea, o que acontece nos casos de anemia, enquanto a sua ausência em doentes anémicos alerta para a disfunção da medula óssea. Os reticulócitos são, portanto, um bom parâmetro para o diagnóstico e monitorização de casos de anemias. (World Health Organization (WHO), 2013)

Quando observados num esfregaço de sangue periférico, corado pela técnica de Wright-Giemsa, os reticulócitos têm uma aparência acinzentada e são de maior tamanho, quando comparados com os eritrócitos. No entanto, para confirmar a presença de reticulócitos, deve usar-se um diferente tipo de coloração, com um corante específico que se liga ao ácido nucleico dos reticulócitos, o azul de metileno (procedimento da coloração em Anexo). Com esta coloração, os



**Figura 10** - Imagem microscópica da observação de um esfregaço de sangue periférico corado com azul de metileno. Os reticulócitos presentes apresentam granulações azuis no seu interior.  
Fonte: Setor de Hematologia IPO de Coimbra

reticulócitos adquirem granações azuis no seu interior, o que os torna mais facilmente identificáveis, como se pode observar na Figura 10. (Rahman, 2016) (Pozzobon, 2017)

### Plaquetograma

O plaquetograma permite uma análise plaquetar quantitativa e qualitativa e os parâmetros que permite determinar encontram-se na Tabela xii. As plaquetas têm origem na fragmentação do citoplasma dos megacariócitos, possuem formato discoide irregular, diâmetro médio de 2,6  $\mu\text{m}$  e uma estrutura extremamente complexa. Apesar de não serem células completas, elas apresentam alguns organelos e são ricas em ATP, tendo um papel preponderante na resposta hemostática. (Hoffbrand e Moss, 2016)

O plaquetócrito corresponde ao volume de plaquetas presente na totalidade de volume de sangue. O PDW é um valor calculado que depende do volume plaquetário. (Monteiro, 2017)

Tabela xii - Parâmetros determinados pelo plaquetograma.

<b>PLT (<math>\times 10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	Valor plaquetar absoluto
<b>MPV (fL)</b>	Volume plaquetar médio
<b>PCT (%)</b>	Plaquetócrito
<b>PDW</b>	Dispersão do volume plaquetar

### Esfregaço de sangue periférico

A técnica do **esfregaço de sangue periférico** (Figura 11) consiste na análise de uma gota de sangue que é observada, sobre uma lâmina, ao microscópio, à objetiva de 50x (imersão em óleo). O esfregaço é submetido a uma coloração, coloração de Wright-Giemsa modificada (procedimento em Anexo), realizada automaticamente pelo sistema Aerospray<sup>®</sup> 7150 Hematology Slide Stainer Centrifuge, que permite a identificação das várias linhas celulares presentes na amostra. (Hamid, 2008) Esta técnica revela-se útil na análise da

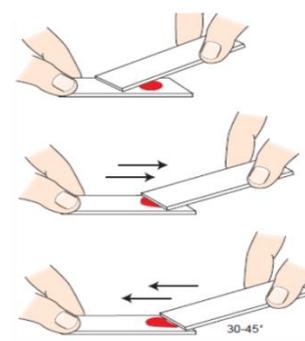


Figura 11 - Imagem representativa da técnica de esfregaço de sangue periférico. Fonte: (Rahman, 2016)

morfologia eritrocitária (Figura 12), leucocitária e plaquetária, assim como na deteção de células anormais e parasitas sanguíneos. (Hamid, 2008)

No laboratório de hematologia, a técnica do esfregaço de sangue periférico é realizada quando é necessária a confirmação de resultados fornecidos pelo equipamento, quando este não consegue atribuir valores devido à presença de células anormais, ou quando os valores obtidos são alarmantes (exs: basófilos  $>2\%$ ; leucócitos  $>20 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) e se encontram em discordância com o historial do doente. Por exemplo, valores anormalmente

baixos de hemoglobina ou plaquetas (com alarme para agregados plaquetares) podem surgir em consequência da presença de um coágulo na amostra em análise, o que leva à necessidade de pedir uma segunda amostra para nova análise.

Red cell abnormality	Causes	Red cell abnormality	Causes
	Normal		Hereditary spherocytosis, autoimmune haemolytic anaemia, septicaemia
	Liver disease, alcoholism. Oval in megaloblastic anaemia		DIC, microangiopathy, HUS, TTP, burns, cardiac valves
	Iron deficiency, liver disease, haemoglobinopathies, post-splenectomy		Hereditary elliptocytosis
	Liver disease, alcoholism		Myelofibrosis, extramedullary haemopoiesis
	Iron deficiency		Oxidant damage—e.g. G6PD deficiency, unstable haemoglobin
	Liver disease, post-splenectomy, storage artefact		Sickle cell anaemia
	Liver disease, abetalipoproteinaemia, renal failure		Iron deficiency, haemoglobinopathy

**Figura 12** - Algumas das mais frequentes alterações eritrocitárias em tamanho (anisocitose) e forma (poiquilocitose) e respetivas causas. DIC, coagulopatia intravascular disseminada; G6PD, glucose-6-fosfato desidrogenase; HUS, síndrome hemolítica-urémica; TTP, púrpura trombocitopénica trombótica.

Fonte: (Hoffbrand e Moss, 2016)

## Medulograma

Por vezes é necessária a análise adicional do aspirado de medula óssea para o diagnóstico de certas patologias hematológicas. Estas amostras são colhidas para tubos com EDTA (dois por amostra) e são preparados esfregaços para observação ao microscópio. Este tipo de esfregaço pode ser corado pela técnica de Wright-Giemsa modificada, para a avaliação qualitativa e quantitativa das células; ou pela coloração de Perl's, que permite a observação dos depósitos de ferro, o que é particularmente importante nas anemias e síndromes mielodisplásicas (SMD).

### 2.5.3.3 Alterações patológicas das várias linhas celulares

## Anemia

A anemia é definida como uma diminuição do valor de concentração de hemoglobina para além do limiar da normalidade para a idade e o sexo do doente. A OMS considera um doente adulto como anémico caso este apresente uma concentração inferior a 130 g/L, caso seja do sexo masculino, ou inferior a 120 g/L para doentes do sexo feminino. As anemias

podem ser classificadas por grupos, como apresentado na Tabela xiii. (Hoffbrand e Moss, 2016)

A contagem reticulocitária encontra-se, se a função medular não estiver alterada, aumentada nos casos de anemia devido ao aumento dos níveis de eritropoietina, e é tanto mais elevada quanto maior a severidade da patologia.

**Tabela xiii** - Classificação das anemias.

Fonte: (Hoffbrand e Moss, 2016)

<b>Anemias microcíticas hipocrômicas</b>	<b>Anemias normocíticas normocrômicas</b>	<b>Anemias macrocíticas</b>
MCV <80 fL MCH <27 pg	MCV <80-95 fL MCH ≥27 pg	MCV >95 fL
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Talassemias</li> <li>▪ Anemia da doença crónica (alguns casos)</li> <li>▪ Anemia sideroblástica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Anemias hemolíticas</li> <li>▪ Anemia da doença crónica (alguns casos)</li> <li>▪ Perda de sangue aguda</li> <li>▪ Doença renal</li> <li>▪ Falência da medula óssea (aplasia medular)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Megaloblástica: deficiência de vitamina B12 ou ácido fólico</li> <li>▪ Não megaloblástica: doença hepática, álcool, mielodisplasia, entre outras causas</li> </ul>

A análise do esfregaço de sangue periférico é importante nos casos de anemia, isto porque a morfologia anormal ou presença de inclusões ao nível dos eritrócitos pode sugerir um diagnóstico particular. (Hoffbrand e Moss, 2016)

A causa mais frequente de **anemia microcítica hipocrômica** é a existência de um défice de ferro, sendo esta a causa mais comum das anemias no geral. Este tipo de anemia é caracterizado por valores de MCV e MCH reduzidos e pela presença de eritrócitos pequenos (microcíticos) e descorados (hipocrômicos). Estas características aparecem como consequência de uma falha na síntese de hemoglobina. Pela análise de um esfregaço de sangue periférico obtido de um doente com este tipo de anemia, pode também observar-se poiquilcitose com ocasionais codócitos e eritrócitos em forma de lápis. Neste tipo de anemias há ausência de reservas medulares de ferro. (Hoffbrand e Moss, 2016)

As **anemias macrocíticas** são caracterizadas pela presença de eritrócitos anormalmente grandes (macrócitos) e podem ser classificadas como *megaloblásticas* ou *não megaloblásticas*, consoante a aparência dos eritroblastos em desenvolvimento na medula óssea. (Hoffbrand e Moss, 2016)

As anemias classificadas como *megaloblásticas* apresentam, ao nível da medula óssea, eritroblastos cuja maturação do núcleo se encontra atrasada em relação à do citoplasma. Esta maturação assíncrona tem como causa uma falha na síntese de DNA, geralmente originada por défice de vitamina B<sub>12</sub> ou ácido fólico. O défice de folato causa anemia

megaloblástica uma vez que inibe a síntese de timidina monofosfato, enquanto a vitamina B<sub>12</sub> tem um papel indireto na síntese de DNA, por ser necessária à síntese de substratos que estão na origem do ácido fólico. Este déficit de folato pode ser uma consequência de uma neoplasia, caso em que a necessidade de folato por parte do organismo aumenta. (Hoffbrand e Moss, 2016) (Khallafallah e Mohamed, 2012) Existem ainda agentes quimioterápicos que podem afetar a síntese de DNA, como é o caso do metotrexato, que pode assim levar também ao aparecimento de uma anemia megaloblástica. (Qahtani, 2018)

Em termos de observações do esfregaço de sangue periférico, as anemias megaloblásticas caracterizam-se pela presença de macrócitos tipicamente ovais, por uma contagem baixa de reticulócitos e pela presença de neutrófilos hiperlobulados. (Hoffbrand e Moss, 2016)

Podem ser várias as causas de *anemias macrocíticas não megaloblásticas*. Um dos mecanismos potencialmente envolvidos na origem destes macrócitos é a alteração dos tempos de maturação dos eritroblastos na medula óssea, o que pode ser causado por tratamentos de quimioterapia. A origem das anemias não megaloblásticas pode estar relacionada com situações como: síndromes mielodisplásicas; reticulocitose ou casos de paraproteinemia, como é o caso do Mieloma múltiplo. (Hoffbrand e Moss, 2016)

As **anemias normocíticas normocrômicas** são caracterizadas por uma hemoglobinação e um MCV de valores normais. Este tipo de anemias pode ser explicado, de forma mais geral, por três mecanismos distintos: perda aguda de sangue; um turnover celular acelerado; e supressão da produção celular causada, por exemplo, por infiltração medular por metástases tumorais. (Theml, Diem e Haferlach, 2004)

A anemia da doença crônica (ADC) desenvolve-se em doentes que apresentam patologias com um quadro inflamatório associado, como é o caso das neoplasias. Este tipo de anemia tem, tipicamente, características normocrômicas e normocíticas podendo, em alguns casos, evoluir para uma anemia hipocrômica microcítica ligeira. Em termos de severidade, este tipo de anemia apresenta um grau leve e não progressivo e está ainda associada a níveis baixos de ferro sérico. (Cançado e Chiatton, 2002) (Hoffbrand e Moss, 2016)

## **Hemoglobinopatias**

Em condições normais, um adulto possui, no seu sangue, três tipos de hemoglobina, que diferem no tipo de cadeia proteica que compõe a sua estrutura molecular: a maioritária

é denominada de Hb A e é constituída por duas cadeias tipo  $\alpha$  e duas de tipo  $\beta$  ( $\alpha_2\beta_2$ ); as minoritárias correspondem à Hb Fetal ( $\alpha_2\gamma_2$ ) e à Hb A2 ( $\alpha_2\delta_2$ ). (Hoffbrand e Moss, 2016)

As alterações patológicas da molécula de hemoglobina podem resultar de dois fenómenos distintos: síntese de hemoglobina anormal (hemoglobinopatias qualitativas) ou síntese reduzida de cadeias  $\alpha$  ou  $\beta$  (hemoglobinopatias quantitativas). (Hoffbrand e Moss, 2016) As hemoglobinopatias qualitativas não foram alvo de análise durante o estágio.

No laboratório de patologia clínica do IPO de Coimbra, o diagnóstico definitivo das hemoglobinopatias é realizado no Setor de Imunologia, onde é feita a separação eletroforética das variantes de hemoglobina pelo aparelho Hydrasis<sup>®</sup>. Este procedimento permite a separação das frações normais A e A2 da hemoglobina e a deteção das variantes anómalas mais comuns, nomeadamente, hemoglobina S, D, C e. A eletroforese é uma técnica laboratorial que permite a separação das proteínas presentes em vários tipos de amostra segundo as suas cargas elétricas e o seu peso molecular. A migração proteica, segundo as características mencionadas, conduz à formação de bandas que são proporcionais à quantidade de proteína presente. (Oliveira *et al.*, 2015)

As **talassemias** compreendem um grupo heterogéneo de patologias genéticas que se caracterizam por uma redução na síntese de cadeias  $\alpha$  ou  $\beta$ , sendo, portanto, classificadas como hemoglobinopatias quantitativas. Clinicamente, as principais síndromes são: talassemia major, dependente de transfusões; talassemia intermédia, não dependente de transfusões e associada a uma anemia de grau moderado; e talassemia minor, geralmente associada a portadores de  $\alpha$  ou  $\beta$ -talassemia. (Hoffbrand e Moss, 2016)

As  *$\alpha$ -talassemias* têm como causa mutações ao nível do gene codificador da globina  $\alpha$ . A severidade, em termos clínicos, desta patologia depende do número de genes associados a esta globina que se encontram inativos ou ausentes, sendo que a esta se encontram associados, no total, quatro genes. As  *$\alpha$ -talassemias* caracterizam-se por um MCV e MCH baixos e por uma contagem eritrocitária superior a  $5,5 \times 10^{12}/L$ . (Hoffbrand e Moss, 2016)

A síndrome major da  *$\beta$ -talassemia* caracteriza-se pela síntese reduzida ou ausente de  $\beta$  globina, levando ao aparecimento de um excesso de cadeias  $\alpha$  que acabam por precipitar no interior dos eritroblastos e eritrócitos, o que tem como consequência uma eritropoiese ineficaz e a ocorrência de hemólise. Em termos de diagnóstico laboratorial, o esfregaço de sangue periférico característico das  *$\beta$ -talassemias* apresenta eritrócitos hipocrómicos e microcíticos, codocitos e pontilhado basofílico. (Hoffbrand e Moss, 2016)

## Alterações leucocitárias e plaquetares

Os **neutrófilos** são células com núcleo segmentado, possuindo em condições normais, entre dois e cinco lóbulos, e com um citoplasma de contornos irregulares composto por grânulos. A sua principal função no organismo consiste na fagocitose e neutralização de agentes estranhos e patogênicos. O aumento dos neutrófilos em circulação para valores superiores a  $7,5 \times 10^9/L$  é das alterações mais frequentes em termos de contagem de células sanguíneas. Este fenómeno denomina-se de *neutrofilia* e pode ter como causas: infeções bacterianas; processos inflamatórios; neoplasias; entre outras. (Hoffbrand e Moss, 2016) (Hamid, 2011)

A ocorrência de *neutropenia* corresponde a um valor abaixo do limite inferior de referência. Contagens inferiores a  $0,5 \times 10^9/L$  aumentam muito a probabilidade do aparecimento de infeções recorrentes, enquanto uma descida abaixo dos  $0,2 \times 10^9/L$  envolve riscos muito sérios. As neutropenias podem ter várias causas, como por exemplo, os casos de neutropenia induzida por fármacos. (Hoffbrand e Moss, 2016)

Os **monócitos** são, geralmente, os leucócitos de maior tamanho, apresentando um núcleo igualmente grande e de forma variável. O citoplasma destas células contém numerosos vacúolos e, por vezes, alguns grânulos. Os monócitos têm como principal função a fagocitose de agentes potencialmente perigosos. A ocorrência de **monocitose**, uma contagem de monócitos acima do valor de referência ( $>0,8 \times 10^9/L$ ), não é uma situação frequente. Esta condição pode ser consequência de infeções bacterianas crónicas; patologias do tecido conjuntivo; infeções por protozoários; neutropenia crónica, ou patologias malignas. (Hoffbrand e Moss, 2016) (Hamid, 2011).

Os **eosinófilos** apresentam um núcleo segmentado, raramente com mais de três lóbulos, e possuem no seu citoplasma grânulos de grande tamanho que coram fortemente de vermelho ou laranja. Este tipo de células participa em reações inflamatórias, na defesa contra parasitas e na remoção da fibrina formada durante o processo inflamatório. O aumento da contagem de eosinófilos para valores superiores a  $0,8 \times 10^9/L$ , *eosinofilia*, pode surgir devido a patologias alérgicas, infeções parasitárias, patologias cutâneas (psoríase, urticária, por exemplo), casos de sensibilidade a fármacos, entre outras causas. (Hoffbrand e Moss, 2016)

Os **basófilos** são observados apenas ocasionalmente no sangue periférico. Estas células contêm grânulos citoplasmáticos numerosos, escuros e compostos por heparina e histamina. Os casos de *basofilia*, contagem de basófilos superior a  $0,1 \times 10^9/L$ , são incomuns. Este fenómeno pode ser reativo, no entanto, está mais frequentemente associado a casos de patologias mieloproliferativas. (Hoffbrand e Moss, 2016) (Hamid, 2011)

Os **linfócitos** podem ser classificados em B, T e natural killer (NK). Estas células são essenciais ao desenrolar da resposta imunitária. Os linfócitos B dão origem aos plasmócitos ao atingirem o seu último estágio de maturação. Os plasmócitos têm como função a produção de imunoglobulinas, que têm a capacidade de defender o organismo contra agentes externos. Casos de *linfocitose*, ou seja, de aumento da contagem linfocitária para além do limite de referência, podem ser associados a casos reativos ou a neoplasias de células linfoides maduras. Os casos de diminuição dos valores de contagem linfocitária abaixo dos de referência, ou seja, *linfopenia*, podem surgir como consequência de falência medular severa, terapia imunossupressora e uma variedade de síndromes de imunodeficiência, como é o caso do VIH. (Hoffbrand e Moss, 2016) (Hamid, 2011) (Rego e Santos, 2009)

A **trombocitopenia**, ou seja, a diminuição da contagem plaquetar para valores abaixo do limite mínimo de referência, tem como consequência a ocorrência de hemorragias. A causa mais comum de trombocitopenia é a falha na produção plaquetar que, geralmente, surge em consequência de uma falência medular generalizada. (Hoffbrand e Moss, 2016) A presença de **trombocitose**, ou seja, de uma quantidade excessiva de plaquetas em circulação, pode ser consequência de um processo reativo ou de uma patologia clonal. As trombocitoses de origem clonal estão associadas a neoplasias mieloproliferativas, com especial destaque para a trombocitemia essencial. (Bleeker e Hogan, 2011)

## **Patologias hematológicas malignas**

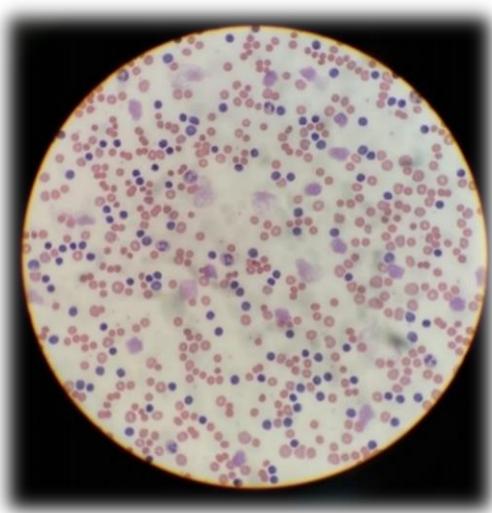
### ***Leucemias***

As leucemias englobam um grupo de patologias caracterizado pela acumulação de células sanguíneas malignas no sangue periférico e na medula óssea. A presença e acumulação destas células anormais leva a falência medular, o que tem como consequência pancitopenia, e a processos de infiltração que podem afetar vários órgãos. As leucemias podem ser classificadas em quatro tipos principais. Esta classificação consiste na separação entre leucemias crónicas e agudas e, dentro de cada um destes grupos, da distinção entre leucemias de linha mieloide e linfóide. (Hoffbrand e Moss, 2016)

As **leucemias agudas** caracterizam-se pela sua agressividade. A transformação maligna ocorre ao nível da célula hematopoiética estaminal ou de progenitores mais imaturos, e as alterações genéticas associadas conduzem a um aumento da taxa de proliferação celular, a uma inibição do processo apoptótico e a bloqueios na diferenciação

celular. A característica clínica principal associada a leucemia aguda é a falência medular como consequência da acumulação de blastos. (Hoffbrand e Moss, 2016)

As **leucemias crónicas** distinguem-se das agudas pela sua progressão mais lenta. Tal



**Figura 13** - Caso de anemia hemolítica autoimune associada a LLC. O esfregaço de sangue periférico revela a presença de linfócitos característicos (pequenos, com pouco citoplasma e cromatina de aspeto grumoso) e de sombras nucleares.

Fonte: Setor de Hematologia do IPO de Coimbra

como acontece nas leucemias agudas, as de carácter crónico são também subdivididas em mieloides e linfoides, consoante a linha celular afetada. (Hoffbrand e Moss, 2016)

A **leucemia linfocítica crónica (LLC)** é das patologias hematológicas mais frequentemente diagnosticada/monitorizada no laboratório de hematologia do IPO de Coimbra. De facto, esta leucemia é a mais comum dentro do seu grupo, com um pico de incidência entre os 60 e os 80 anos de idade. A LLC caracteriza-se pela presença de linfócitos B maduros anormais com fraca expressão de imunoglobulinas de superfície. Estas células apresentam uma inibição do processo apoptótico o que tem como consequência a sua

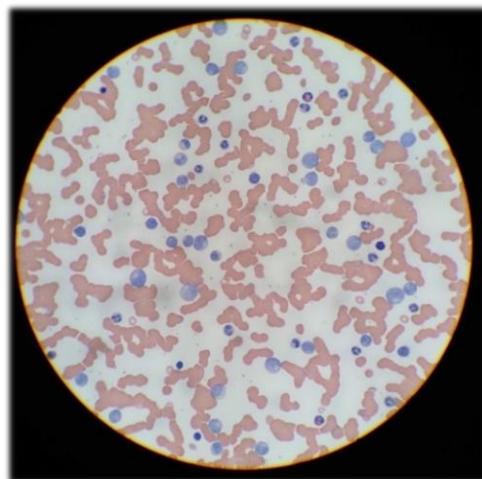
acumulação no sangue, medula óssea, fígado, baço e nódulos linfáticos. (Hoffbrand e Moss, 2016)

Em termos de análise laboratorial, o aspeto mais evidente é a presença de linfocitose, sendo que 70% a 90% dos leucócitos que surgem no esfregaço de sangue periférico correspondem a linfócitos anormalmente pequenos, com pouco citoplasma e cromatina de aspeto grumoso. É também característica a presença de sombras nucleares. É comum nestes doentes o desenvolvimento de autoimunidade contra células sanguíneas, sendo que a anemia hemolítica é o caso mais frequente (Figura 13). (Hoffbrand e Moss, 2016)

### ***Patologias mieloproliferativas***

As neoplasias mieloproliferativas correspondem a um grupo de patologias com origem em alterações que ocorrem ao nível das células estaminais hematopoiéticas, e que se caracterizam pela consequente proliferação descontrolada de um ou mais componentes hematopoiéticos. (Hoffbrand e Moss, 2016)

A **leucemia mieloide crónica (LMC)** é uma patologia mieloproliferativa que se caracteriza pela presença de uma mutação adquirida que afeta uma célula estaminal hematopoiética. Em termos da análise laboratorial, caracteriza-se por uma leucocitose com valores que podem ultrapassar os  $200 \times 10^9/L$ , com a proliferação de células de linha mieloide (Figura 14), incluindo de formas imaturas, e pelo aumento dos basófilos em circulação (basofilia). Para além disto, esta patologia pode estar associada ao aparecimento de uma anemia normocromica normocítica. Cerca de 95% dos doentes com LMC apresentam uma mutação cromossómica a qual resulta no aparecimento de um cromossoma anormal denominado de cromossoma Philadelphia (Ph), que pode ser detetado laboratorialmente pela realização de um teste de Biologia Molecular. (Hoffbrand e Moss, 2016) (Bollmann e Giglio, 2011)

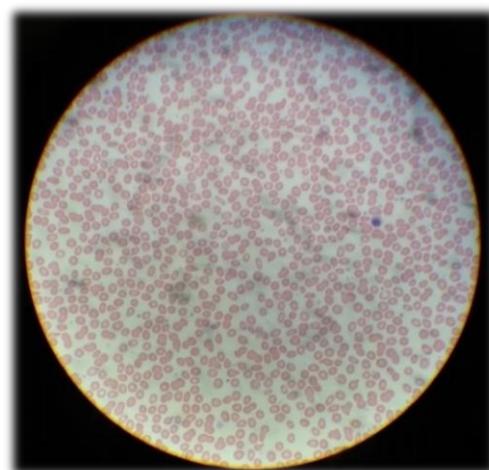


**Figura 14** - Esfregaço de sangue periférico correspondente a um caso de LMC. Pode observar-se uma proliferação de células de linhagem mieloide, nomeadamente, monócitos, neutrófilos e eosinófilos. Pode também ser observado um basófilo.

Fonte: Setor de Hematologia do IPO de Coimbra

A **mielofibrose primária** caracteriza-se pela progressão generalizada de um processo fibrótico reativo que afeta a medula óssea, em associação com o desenvolvimento da hematopoiese no baço e fígado, uma condição denominada de metaplasia mieloide. É característico o aparecimento de anemia. O processo fibrótico é secundário ao processo clonal, sendo desencadeado pela hiperplasia de megacariócitos anormais. Os fibroblastos são estimulados pelos fatores de crescimento de origem plaquetar e por citocinas secretadas quer por plaquetas quer por megacariócitos. (Hoffbrand e Moss, 2016) (Provan, 2003)

As análises laboratoriais revelam uma contagem plaquetar e leucocitária elevadas numa fase precoce, em contraste com o aparecimento de leucopenia e trombocitopenia em estádios mais avançados da doença; um esfregaço de sangue periférico leucoeritroblástico e com aparecimento de dacriócitos (Figura 15). (Hoffbrand e Moss, 2016)



**Figura 15** - Esfregaço de sangue periférico correspondente a um caso de mielofibrose primária. Pode observar-se um eritroblasto e a presença de poiquilocitose eritrocitária, com especial destaque para os dacriócitos.

Fonte: Setor de Hematologia do IPO de Coimbra

## ***Síndromes mielodisplásicas***

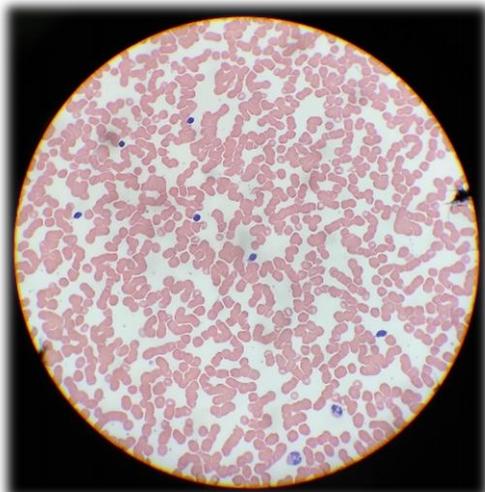
As **SMD** são um grupo de patologias clonais das células estaminais hematopoiéticas caracterizadas por uma crescente falência medular em associação com alterações displásicas em pelo menos uma das linhas celulares. Estas alterações displásicas são muito variadas e incluem: corpos de Howell-Jolly e pontilhados basofílicos na linha eritroide; hipersegmentação e agranulação citoplasmática na linha granulocítica; e, relativamente à série megacariocítica, as características displásicas só são observáveis ao nível da medula óssea. (YAMASAKI, 2005) Este tipo de patologia é caracterizado pela proliferação e, simultaneamente, apoptose das células hematopoiéticas, o que conduz a uma condição de pancitopenia ao nível do sangue periférico. Este tipo de síndromes pode ser subdividido em vários subtipos consoante características específicas do esfregaço de sangue periférico e de medula óssea, nomeadamente, a percentagem de blastos, a quantidade de linhas celulares com características displásicas e a presença de sideroblastos em anel. Na maioria dos casos, as síndromes mielodisplásicas são uma patologia primária, no entanto, uma percentagem significativa dos doentes adquire este tipo de patologia como consequência dos tratamentos realizados a outra patologia maligna (quimioterapia e/ou radioterapia). A esta condição dá-se o nome de Síndrome mielodisplásica associada à terapia (t-MSD). (Hoffbrand e Moss, 2016)

Existem ainda neoplasias com características mieloproliferativas e mielodisplásicas, em simultâneo, as **síndromes mielodisplásicas/mieloproliferativas**. Este tipo de patologias malignas é caracterizado pela presença de características displásicas associada à proliferação de uma ou mais linhas celulares. (Hoffbrand e Moss, 2016) Um exemplo deste tipo de patologia é a leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), caracterizada por uma monocitose crónica. O diagnóstico desta patologia baseia-se na presença de monocitose persistente (>3 meses), no sangue periférico:  $\geq 1 \times 10^9/L$  da contagem absoluta e  $\geq 10\%$  relativamente à proporção de leucócitos; em conjunto com a presença de características displásicas na medula óssea. (Patnaik e Tefferi, 2018)

## ***Linfomas***

Os linfomas consistem num grupo onde estão inseridas diversas patologias que se caracterizam pela acumulação de linfócitos malignos ao nível dos nódulos linfáticos e outros tecidos linfoides. Esta acumulação leva ao aparecimento de linfadenopatias, a característica clínica mais associada aos linfomas. Ocasionalmente, estas células podem invadir a circulação sanguínea (fase leucémica), ou causar infiltrações em órgãos não linfoides. Os linfomas podem ser subdivididos em dois grupos principais: Hodgkin e não Hodgkin. (Hoffbrand e Moss, 2016)

Os **linfomas de Hodgkin** são identificados pela presença e proliferação de células malignas com morfologia variável, que consistem normalmente em linfócitos B multinucleados, denominadas de células de Reed-Sternberg. (Rocha Miranda *et al.*, 2011)



**Figura 16** - Esfregaço de sangue periférico de um caso de linfoma linfoplasmocítico com linfocitose caracterizada pela presença de linfócitos tipicamente pequenos e de morfologia anormal.

Fonte: Setor de Hematologia do IPO de Coimbra

Os **linfomas não Hodgkin** (LNH) englobam um grande grupo de tumores linfoides, 85% dos quais com a sua origem em linfócitos B. A origem celular deste tipo de linfomas determina a sua classificação, segundo a OMS. (Hoffbrand e Moss, 2016)

O linfoma linfoplasmocítico é um exemplo de linfoma não Hodgkin. Esta é uma neoplasia crónica caracterizada pela proliferação de pequenos linfócitos B (Figura 16) e plasmócitos com envolvimento da medula óssea, nódulos linfáticos e baço. O envolvimento da medula óssea pode levar ao aparecimento de anemia, neutropenia ou trombocitopenia. (Hoffbrand e Moss, 2016) (Naderi e Yang, 2013)

### ***Mieloma múltiplo***

O mieloma múltiplo é uma doença maligna caracterizada pela proliferação e acumulação de plasmócitos ao nível da medula óssea e pela presença de proteína monoclonal no soro e/ou urina. (Hoffbrand e Moss, 2016)

Os casos de mieloma múltiplo, em termos laboratoriais, são caracterizados pela presença de proteína monoclonal no soro e/ou urina; pelo número elevado de plasmócitos monoclonais na medula óssea e pelo dano a órgãos ou tecidos associados. Este dano pode ser avaliado pelos critérios CRAB (hipercalcémia, insuficiência renal, anemia e lesões osteolíticas). (Hoffbrand e Moss, 2016)

Segundo a mais recente atualização do Grupo de Trabalho Internacional do Mieloma, o diagnóstico definitivo de Mieloma Múltiplo implica a existência de  $\geq 10\%$  de plasmócitos clonais na medula óssea ou a presença de plasmocitoma ósseo ou extra-medular, detetado por biópsia, e, adicionalmente, qualquer um dos seguintes eventos definidores de mieloma: evidência de dano em órgãos, de acordo com os critérios CRAB ou presença de biomarcadores de malignidade ( $\geq 60\%$  de plasmócitos monoclonais na medula óssea; razão entre cadeia leve livre afetada versus não afetada  $\geq 100$ , desde que a concentração absoluta

da cadeia leve afetada seja  $\geq 100$  mg/L; mais de uma lesão focal com  $\geq 5$ mm, detetadas por ressonância). (Moreau *et al.*, 2017)

A quantidade de cadeias leves livres no soro encontra-se elevada enquanto os níveis de imunoglobulinas se apresentam reduzidos, uma condição denominada de imunoparesia. A acumulação de cadeias leves livres leva a um excesso que conduz à sua eliminação pela urina, uma condição denominada de proteinúria de Bence-Jones, que se verifica na maioria dos casos de mieloma múltiplo. A detecção destas proteínas é, portanto, de grande importância para o diagnóstico de casos desta patologia. Esta detecção é feita no Setor de Imunologia através de uma separação eletroforetica, seguida de uma imunoprecipitação, que ocorre como consequência da adição de antissoros com especificidade para cadeias leves e pesadas. As imunoglobulinas monoclonais apresentam-se sob a forma de bandas anómalas situadas na zona das globulinas  $\beta$  ou  $\gamma$ . (Tomaz *et al.*, 2017)

A anemia associada a esta patologia apresenta, normalmente, características normocrómicas e normocíticas ou macrocíticas e uma das apresentações mais características desta patologia, que pode ser observada no esfregaço de sangue periférico, é a disposição dos eritrócitos em formações rouleaux, o que acontece devido à elevada quantidade de proteína em circulação. (Hoffbrand e Moss, 2016)

#### 2.5.4 Velocidade de sedimentação

Este é um teste que, apesar de não ser patologicamente específico, é frequentemente utilizado, e permite a determinação da velocidade a que os eritrócitos presentes numa amostra sedimentam. O valor deste teste depende essencialmente da concentração plasmática de proteínas de elevada massa molecular, como é o caso do fibrinogénio e das imunoglobulinas. (Hoffbrand e Moss, 2016) A presença de proteínas plasmáticas facilita a sedimentação dos eritrócitos, uma vez que estas neutralizam as cargas negativas à superfície dos glóbulos vermelhos permitindo assim a sua agregação e consequente sedimentação. (Santos, Cunha e Cunha, 2000)

A determinação da velocidade de sedimentação eritrocitária é, deste modo, útil no sentido em que permite avaliar a atividade inflamatória, sendo necessário ter em conta que, devido à sua inespecificidade, é muito importante ter em consideração, aquando da sua interpretação, o contexto clínico em que é solicitado. (Chakr e Alegretti, 2011)

#### 2.5.4.1 Metodologia

As determinações das velocidades de sedimentação eritrocitárias são realizadas no equipamento ALI FAX® Test I BCL que utiliza como técnica a fotometria cinética capilar. O aparelho mede a densidade ótica da amostra, que se relaciona com a agregação eritrocitária. Os dados assim obtidos são organizados num modelo de regressão linear que permite, por extrapolação gráfica, a determinação da velocidade de sedimentação, cujo resultado é dado em mm/h. (Chakr e Alegretti, 2011) (Soares e Santos, 2009)

#### 2.5.4.2 Alterações associadas a patologias

A velocidade de sedimentação aumenta com a atividade inflamatória, uma vez que nestas condições, há um aumento dos níveis séricos das proteínas de fase aguda. Assim sendo, valores elevados podem estar associados a um vasto leque de patologias, nomeadamente, doenças infecciosas, doenças reumatológicas e neoplasias, como é o caso do mieloma múltiplo. (Chakr e Alegretti, 2011)

Os valores de VS dependem também de fatores como a idade, os níveis de fibrinogénio e a hemoglobina. (Chakr e Alegretti, 2011)

### 2.5.5 Testes de coagulação sanguínea

#### 2.5.5.1 Metodologia

Os parâmetros que permitem avaliar a coagulação sanguínea são determinados pelo equipamento ACL TOP 500 que utiliza a técnica de turbidimetria para realizar as suas determinações. A turbidimetria é uma técnica ótica que consiste na deteção e medição da redução da intensidade de um feixe de luz incidente, causada pela sua passagem através de uma solução constituída por partículas. Há um aumento da turvação da amostra aquando da transformação do fibrinogénio solúvel em fibrina insolúvel, o que se traduz numa redução da intensidade do feixe de luz detetado pelo aparelho, permitindo assim determinar o tempo que a amostra leva a coagular. (Curtis *et al.*, 2008) (Koepke, 2000)

## 2.5.5.2 Parâmetros determinados e alterações patológicas associadas

### **Tempo de Protrombina**

O tempo de protrombina (TP) avalia as vias extrínseca e comum da coagulação, dependendo da integridade dos fatores VII (via extrínseca), V, II e X (via comum). Para a realização deste teste, é adicionado, ao plasma do doente, tromboplastina (fator tecidual) que, na presença de íões de cálcio, ativa a via extrínseca. O tempo, após a adição do reagente do teste, que demora até à formação do coágulo corresponde ao resultado final. (Saraiva *et al.*, 2010)

Um tempo de protrombina prolongado pode alertar para patologias hereditárias, principalmente as associadas ao fator VII, para o qual este teste tem maior sensibilidade, ou para patologias adquiridas como é o caso da deficiência de vitamina K, doença hepática, coagulação intravascular disseminada ou o uso de medicamentos. Este é também o teste de eleição para averiguar a toma de anticoagulantes orais inibidores da vitamina K, sendo que esta atua como cofator no processo de formação dos fatores II, VII, IX e X. O Varfine, um fármaco anticoagulante cujo princípio ativo é a Varfarina, é dos inibidores de vitamina K mais utilizados na terapêutica anticoagulante. (Saraiva *et al.*, 2010) (Klack e Carvalho, 2006)

Caso se verifique um aumento no TP, deve realizar-se o teste de mistura, no qual se adiciona plasma normal ao plasma em análise na proporção de 1:2. A realização deste teste tem como objetivo averiguar se o prolongamento do TP se deve a uma deficiência de um fator ou à presença de um inibidor. (Saraiva *et al.*, 2010)

A origem da tromboplastina utilizada para a realização deste teste pode diferir entre laboratórios, o que pode levar à obtenção de resultados diferentes para um mesmo doente, sobre as mesmas condições. Para contornar este problema, foi estabelecida uma tromboplastina padrão, a qual deve servir como comparação para os reagentes utilizados por qualquer laboratório. Esta comparação é estabelecida pelo Índice de Sensibilidade Internacional (ISI), que deve ser determinado por todos os fabricantes do reagente de tromboplastina, mediante a padronização do seu reagente frente a uma tromboplastina de referência internacional. Deste modo, quanto mais próximo de 1,0 for o valor do ISI, maior a aproximação da tromboplastina de referência. A Relação Normatizada Internacional (RNI), cuja fórmula de determinação se encontra apresentada na Figura 17, foi instituída pela Organização Mundial de Saúde com o

$$RNI = R^{ISI},$$

$$\text{onde } R = \frac{TP \text{ paciente}}{TP \text{ controle}}$$

**Figura 17** - Fórmula utilizada para a determinação da Relação Normatizada Internacional.

Fonte: (Reis *et al.*, 2005)

intuito de padronizar, entre os vários laboratórios, os fatores variantes (reagente, equipamento, entre outros) que interferem com os resultados do TP. (Saraiva *et al.*, 2010)

### ***Tempo de tromboplastina parcial ativada***

O teste para determinação do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) avalia o funcionamento das vias intrínseca e comum da cascata de coagulação através da detecção de alterações dos fatores XII, XI, IX e VIII (via intrínseca) bem como dos fatores X, V, II e fibrinogénio (via comum). Neste teste são adicionados, à amostra de plasma, fosfolípidos sintéticos que, em conjunto com a adição de cloreto de cálcio, permitem a ativação da via intrínseca. O tempo, após a adição dos reagentes, que decorre até à formação do coágulo corresponde ao TTPA. (Saraiva *et al.*, 2010)

Um TTPA prolongado, com um TP normal associado, alerta para uma possível deficiência em pelo menos um dos fatores analisados pelo teste, ou para a presença de um inibidor da via intrínseca. Nestes casos deve realizar-se um teste de mistura que, caso não revele alteração relativamente ao tempo obtido, alerta então para a presença de um inibidor da coagulação. (Saraiva *et al.*, 2010)

O TTPA é o teste de eleição para a pesquisa de anticoagulante lúpico, que é uma imunoglobulina pertencente à família dos anticorpos anti-fosfolípidos e que, portanto, interfere com a ativação da via intrínseca. Contrariamente ao que o nome indica, a presença de anticorpos deste tipo em circulação promove a ocorrência de trombozes, sendo assim, portanto, um agente pró-trombótico e não anticoagulante. (Chiuso, Ferrari e Santos, 2005) (Hoffbrand e Moss, 2016)

Relativamente às patologias associadas a uma deficiência de fatores de coagulação, as mais frequentes são a Hemofilia A, a Hemofilia B e a doença de von Willebrand, todas elas de carácter hereditário. Estas patologias estão associadas a fatores participantes na via intrínseca e, portanto, podem ser detetadas por um prolongamento do TTPA. (Hoffbrand e Moss, 2016)

A **Hemofilia A** é a mais comum das patologias hereditárias associadas a uma deficiência de um fator de coagulação e caracteriza-se por níveis plasmáticos baixos ou ausentes do fator VIII. Em termos de diagnóstico laboratorial, esta patologia está associada a resultados anormais dos testes de TTPA e de doseamento plasmático do fator VIII, enquanto os valores do TP se revelam normais. (Hoffbrand e Moss, 2016)

A **hemofilia B** consiste numa deficiência hereditária do fator IX da coagulação. De notar que para a síntese deste fator é necessária a presença de vitamina K. Em termos

laboratoriais, esta patologia está associada a testes de TTPA e a doseamentos de fator IX anormais e a um TP dentro da normalidade. (Hoffbrand e Moss, 2016)

A **doença de von Willebrand** é caracterizada por um nível plasmático baixo do fator von Willebrand ou pelo seu funcionamento anormal. O FvW tem duas funções no processo de coagulação sanguínea: promove a adesão plaquetar, quer ao endotélio quer entre as próprias plaquetas, e forma um complexo com o fator VIII, protegendo-o contra uma destruição prematura, o que justifica os níveis plasmáticos baixos de fator VIII em doentes com esta patologia. Relativamente ao diagnóstico laboratorial, os testes de doseamento plasmático dos fatores von Willebrand e VIII encontram-se, frequentemente, anormalmente baixos e o TTPA pode estar prolongado. (Hoffbrand e Moss, 2016)

### ***Determinação quantitativa de fibrinogénio pelo método de Clauss***

Neste teste é adicionada trombina em elevada concentração ao plasma do doente para a medição do tempo de coagulação. Na presença de um excesso de trombina, a velocidade da reação passa a depender apenas da concentração de fibrinogénio. A presença de anticoagulantes como a heparina, a partir de determinada concentração, e produtos de degradação de fibrina a partir de certo tamanho, podem diminuir falsamente a dosagem de fibrinogénio assim determinada. (Mackie *et al.*, 2003) (Andriolo *et al.*, 2014)

### ***Tempo de trombina***

O teste do tempo de trombina (TT) permite avaliar o tempo de conversão de fibrinogénio em fibrina, após a adição de trombina. Este teste avalia a funcionalidade do fibrinogénio. (Saraiva *et al.*, 2010)

O TT encontra-se prolongado em casos de toma de heparina, sendo a heparina um inibidor da trombina, nas desfibrinogénias e nas hipofibrinogénias. No caso de doentes com afibrinogénia, a amostra apresenta-se incoagulável. (Saraiva *et al.*, 2010) (Blaya *et al.*, 1998)

### ***D-dímeros***

A determinação quantitativa de D-dímeros é conseguida pela realização de um imunoensaio automatizado com partículas de látex. Nesta técnica, as partículas de látex, que entram em contacto com o plasma em análise, encontram-se revestidas por anticorpos monoclonais anti-D-dímero. Na ausência de D-dímeros na amostra, as partículas de látex permanecem em suspensão dando origem a elevadas leituras turbidimétricas, contrariamente

ao que acontece na presença deste marcador, caso em que se dá a aglutinação das partículas, o que tem como consequência uma diminuição da turvação da amostra e uma leitura turbidimétrica baixa como resultado. (Tripodi, 2011)

Os D-dímeros são um produto específico da degradação de coágulos de fibrina, o que significa que a sua quantificação no plasma é um indicador da deposição e estabilização de fibrina, implicando que a presença de valores elevados são um bom alerta para a formação de trombos. Apesar de este ser um marcador que contribui em muito no diagnóstico laboratorial de patologias relacionadas com a ocorrência de trombose (ex.: coagulação intravascular disseminada e tromboembolismo venoso), é importante ter em conta que existem muitas situações não relacionadas que implicam altas concentrações de D-dímeros (ex.: idade avançada, infeção, cirurgia recente e tumores), o que faz deste um marcador sensível, mas não específico para a ocorrência de trombose. (Tripodi, 2011)

Assim sendo, a quantificação de D-dímeros pode ser fidedignamente utilizada para a exclusão de fenómenos trombóticos, que é o caso quando os valores obtidos são baixos. Por outro lado, valores elevados devem ser confirmados com a realização de mais testes e podem também ser um auxílio na monitorização de doentes com patologias associadas à ocorrência de trombose, ou que estejam sob terapia anticoagulante. (Tripodi, 2011)

### ***Anticoagulantes fisiológicos***

Os principais anticoagulantes fisiológicos são: a antitrombina III, a proteína c e a proteína s. A quantificação laboratorial destes parâmetros tem como objetivo averiguar a existência de uma deficiência ou alteração no funcionamento a eles associados. A antitrombina tem a capacidade de inibir a trombina e o fator Xa e é ativada pela heparina. A proteína C, uma vez ativada e na presença de cálcio, fosfolípidos membranares e do seu cofator não enzimático, a proteína s, degrada os fatores de coagulação V e VIII. (Hamid, 2011) (Machado e Lima, 2008)

## **2.5.6 Imunofenotipagem**

### ***2.5.6.1 Metodologia e parâmetros determinados***

No Setor de Hematologia do IPO de Coimbra o método de imunofenotipagem é realizado pela técnica de citometria de fluxo no analisador FC 500 Cytomics Beckman Coulter®.

A imunofenotipagem é um método que permite a identificação de células através da análise do tipo de antígenos a elas associados. Esta metodologia recorre a anticorpos que reconhecem antígenos celulares específicos de modo a determinar a presença de um determinado tipo de célula em amostras de sangue total, medula óssea ou nódulos linfáticos. De modo a possibilitar a deteção desses mesmos anticorpos, estes são acoplados a uma sonda que pode ser então identificada e quantificada por um citómetro de fluxo. A técnica de citometria de fluxo tem como objetivo a identificação e distinção das diferentes populações celulares, o que é conseguido através da análise da dispersão da luz por elas causada e pelas suas características de imunofluorescência. (Akanni e Palini, 2006)

Com a análise celular por citometria de fluxo podemos avaliar características celulares, nomeadamente, o tamanho, determinado pelo ângulo da luz dispersada frontalmente; e a complexidade interna, representada pelo ângulo da dispersão lateral da luz. Os anticorpos conjugados a fluorocromos ligam proteínas específicas presentes nas membranas celulares ou no interior das células e, ao passarem pela fonte de luz, as moléculas fluorescentes são excitadas e atingem um estado de energia mais elevado. Ao retornarem ao seu estado fundamental, os fluorocromos emitem energia em forma de luz. Ao serem utilizados fluorocromos com diferentes comprimentos de onda de emissão, estes vão emitir cores diferentes ao regressarem ao estado fundamental permitindo assim a determinação simultânea de várias propriedades celulares. No interior do citómetro de fluxo as células em suspensão entram numa corrente criada por fluido isotónico que dá origem a um fluxo laminar permitindo que as células sejam individualmente interseccionadas por um feixe de luz laser monocromática. A luz emitida nas várias direções, após a sua passagem através das células, é direcionada para uma série de filtros e espelhos, o que permite isolar os vários comprimentos de onda. Seguidamente, esta luz é detetada por fotomultiplicadores e digitalizada de modo a permitir uma análise dos dados obtidos por computador. (Akanni e Palini, 2006) (Brown e Wittwer, 2000)

### *2.5.6.2 Alterações associadas a patologias*

A realização de imunofenotipagem pela técnica de citometria de fluxo permite assim caracterizar estados de maturação de células malignas, detetar clonalidade, averiguar a presença de células com características anormais e quantificar células hematopoiéticas. A determinação de todos estes parâmetros permite então, no seu conjunto, caracterizar e diagnosticar tipos específicos de leucemias e linfomas. (Akanni e Palini, 2006)

No Setor de Hematologia, esta análise tem como objetivo o diagnóstico, caracterização e monitorização de patologias hematológicas de linhagem leucocitária. Pode ser analisado qualquer tipo de amostra líquida, sendo possível a análise de compostos sólidos, desde que previamente liquefeitos. No laboratório em questão, estão à disposição cinco fluorocromos diferentes, o que possibilita a determinação de cinco marcadores celulares diferentes por análise.

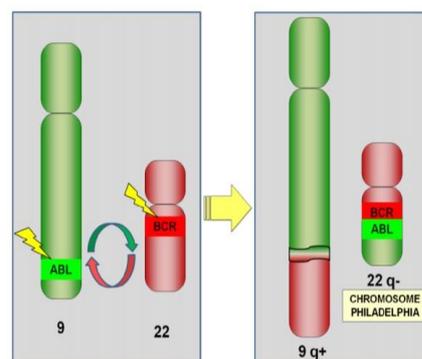
Como anteriormente referido, a LLC é das patologias mais frequentemente diagnosticadas e seguidas no Setor de Hematologia onde decorreu o presente estágio. As células malignas associadas aos casos típicos de LLC apresentam características imunofenóticas específicas: expressam positividade para CD5, CD19 e CD23; expressam fracamente imunoglobulinas membranares e demonstram uma expressão fraca ou mesmo ausente para os marcadores CD79b e FMC7. (Falay e Ozet, 2017)

### 2.5.7 Biologia Molecular

No Setor de Hematologia do IPO de Coimbra recorre-se à Biologia Molecular para a pesquisa da translocação p210 *bcr-abl* (Figura 18) em linfócitos de amostras de sangue periférico de doentes com LMC. Este teste é realizado no equipamento GeneXpert®, por meio do qual se efetua um ensaio de PCR em tempo real quantitativo.

A LMC é caracterizada, a nível molecular, pelo cromossoma Ph que resulta de uma mutação por translocação entre o cromossoma 9 e 22 que origina o gene de fusão *bcr-abl*. Esta alteração génica tem como produto final uma proteína de fusão citoplasmática, nomeadamente, uma tirosina cinase com atividade aumentada, com um peso molecular de 210 kDa que é essencial ao processo de transformação maligna associado à LMC. (Salesse e Verfaillie, 2002)

Este teste tem a sua utilidade aquando dos exames clínicos iniciais em doentes com LMC em fase crónica, no seguimento de doentes, na monitorização de doenças residuais mínimas e na identificação de doentes com elevado risco de sofrer uma reincidência. A realização deste tipo de teste de Biologia Molecular constitui um método específico e sensível para a deteção do gene de fusão *bcr-abl*, o que é particularmente importante na



**Figura 18** - Representação esquemática da translocação que origina o cromossoma de Philadelphia. O gene *abl* encontra-se no braço longo do cromossoma 9; o gene *bcr* está localizado no braço longo do cromossoma 22.  
Fonte: (Falchi et al., 2012)

deteção de doença residual mínima. A qualidade deste teste tem também a potencialidade de reduzir a necessidade de efetuar aspirações de medula óssea para análise, um procedimento invasivo e desagradável para o doente. (Bartley *et al.*, 2015)

## 2.6 Caso clínico

Um doente de 73 anos foi diagnosticado, no IPO de Coimbra, a 31/07/2014 com um linfoma difuso de grandes células B (LDGCB). Este doente, que evidenciava esplenomegalia, foi sujeito a uma esplenectomia, após a qual deixou de evidenciar sinais de patologia, mantendo-se em monitorização pelo Serviço de Hematologia.

O linfoma difuso das grandes células B corresponde ao subtipo mais comum de linfoma não-Hodgkin e é caracterizado pela proliferação de linfócitos B maduros de grande tamanho e pela sua agressividade em termos clínicos. Este tipo de linfoma pode ter origem em linfócitos B em diferentes estádios de diferenciação, presentes no centro germinativo, e surge em consequência de várias mutações génicas que promovem a transformação maligna. (Gouveia, Siqueira e Pereira, 2012) O diagnóstico de LDGCB é elaborado a partir da análise da biópsia de um nódulo linfático anormalmente grande e de aparência suspeita. Relativamente ao seu perfil imunofenotípico, estas células malignas apresentam-se positivas para antigénios característicos das células B: CD19, CD20, CD22, CD79A e CD45. A maioria destas células expressa também imunoglobulina de superfície. (Liu e Barta, 2019)

O doente recorreu ao Serviço de Urgência do Hospital de Leiria, a 05/04/2019, devido a dificuldades respiratórias e foi submetido a uma biópsia de uma massa mediastínica linfomatosa. A partir desta análise, concluiu-se a ocorrência de uma recidiva de LDGCB, com infiltração e obstrução brônquica. O doente foi, então, transferido para o IPO de Coimbra, a 15/04/2019, onde foi submetido a uma TAC toracoabdominal que confirmou a presença da massa relatada e à realização de análises (Tabela xiv).

**Tabela xiv** - Parâmetros de maior relevância, determinados aquando da chegada do doente ao IPO de Coimbra.

Parâmetro	Resultado obtido	Intervalo de referência
Leucócitos	16,5	4,0 – 10,0 ( $\times 10^9/L$ )
Hemoglobina	11,1	13,6 – 18,0 (g/dL)
Plaquetas	152	140 – 440 ( $\times 10^9/L$ )
Proteínas totais	6,6	6 a 7,8 g/dL
Albumina	3,6	3,5 a 5,5 g/dL
Fosfatase alcalina (FA)	295	36 a 92 U/L
Alanina aminotransferase (ALT)	76	0 a 35 U/L
Gama-GT (GGT)	540	8 a 78 U/L
Lactato desidrogenase (LDH)	329	60 a 160 U/L
Proteína C reativa	8,4	0 a 0,8 mg/dL
$\beta 2$ -microglobulina	3,21	0,7 a 1,8 $\mu g/mL$

De entre as análises laboratoriais mais importantes a realizar nos casos de neoplasias hematológicas encontram-se as seguintes: hemograma, VS, marcadores tumorais (Beta2 Microglobulina) e parâmetros bioquímicos (albumina, LDH, proteína C reativa e testes da função hepática). (Silva;, Araújo e Frizzo, 2015)

A realização do hemograma permite averiguar a presença de alterações nas linhas celulares que alertem para o envolvimento da medula óssea. (Serna, 2011) Os casos de LNH em estágios avançados, como é o caso deste doente, em estágio IV de Ann Arbor, estão frequentemente associados ao envolvimento da medula óssea e de órgãos extranodais, o que neste caso é comprovado pela evidência de esplenomegalia e **anemia**. Os testes para avaliação da **função hepática** encontram-se também alterados, como se pode concluir pelos valores das enzimas hepáticas (ALT, FA e GGT). As enzimas FA e GGT são as que possuem valores mais alterados, o que alerta para um envolvimento hepático especialmente direcionado para os canalículos biliares. A presença de colestase por lesões obstrutivas das vias biliares pode estar relacionada com mecanismos associados ao linfoma. (CONITEC, 2016) (EASL, 2009) Os marcadores inflamatórios também se encontram frequentemente elevados em casos de linfoma, o que se verifica relativamente aos valores de **proteína C reativa**. (Silva;, Araújo e Frizzo, 2015) A  **$\beta 2$ -microglobulina**, uma glicoproteína presente em todas as células nucleadas, é um marcador tumoral e de prognóstico pesquisado laboratorialmente em casos de linfoma não-Hodgkin. Além da  $\beta 2$ -microglobulina, valores de albumina sérica  $<4$  g/dL, uma concentração de hemoglobina  $<10,5$  g/dL e uma leucocitose com valores  $>15 \times 10^9/L$ , são também marcadores de prognóstico para casos de linfoma não-Hodgkin. (Almeida et al., 2007) (Colleoni et al., 2009)

O doente iniciou, então, quimioterapia, tendo sido submetido a 3 ciclos antes de nova análise (Tabela xv), realizada duas semanas depois da última:

**Tabela xv** - Parâmetros de maior relevância, determinados após a realização de 3 ciclos de quimioterapia.

Parâmetro	Resultado obtido	Intervalo de referência
Leucócitos	2,1	4,0 – 10,0 ( $\times 10^9$ /L)
Hemoglobina	10,9	13,6 – 18,0 (g/dL)
Plaquetas	145	140 – 440 ( $10^9$ /L)
Proteínas totais	4,5	6 a 7,8 g/dL
Albumina	2,5	3,5 a 5,5 g/dL
Fosfatase alcalina (FA)	154	36 a 92 U/L
Alanina aminotransferase (ALT)	76	0 a 35 U/L
Gama-GT (GGT)	432	8 a 78 U/L
Lactato desidrogenase (LDH)	297	60 a 160 U/L
Proteína C reativa	7,8	0 a 0,8 mg/dL

A 06/05 o doente recorreu a uma consulta com queixas de febre (38,10°C) e expetoração acastanhada, tendo realizado análises (Tabela xvi) e ficado internado. Foram feitas duas colheitas para hemoculturas e três de expetoração, obtidas em 3 dias consecutivos. Devido à suspeita de infeção, deu-se então início à antibioterapia empírica.

**Tabela xvi** - Parâmetros de maior relevância, determinados após o doente ter recorrido a consulta com queixas de febre e expetoração.

Parâmetro	Resultado obtido	Intervalo de referência
Leucócitos	0,2	4,0 – 10,0 ( $\times 10^9$ /L)
Neutrófilos	0,1	1,5 – 8,0 ( $\times 10^9$ /L)
Hemoglobina	9,4	13,6 – 18,0 (g/dL)
Plaquetas	191	140 – 440 ( $\times 10^9$ /L)
Proteínas totais	5,0	6 a 7,8 g/dL
Albumina	2,6	3,5 a 5,5 g/dL
Bilirrubina total	2,7	0,3 a 1,2 mg/dL/dia
Bilirrubina direta	1,8	0 a 0,3 mg/dL
Fosfatase alcalina (FA)	286	36 a 92 U/L
Alanina aminotransferase (ALT)	62	0 a 35 U/L
Gama-GT (GGT)	536	8 a 78 U/L
Lactato desidrogenase (LDH)	normal	60 a 160 U/L
Proteína C reativa	20,5	0 a 0,8 mg/dL
Procalcitonina	3,04	2 ng/mL

Cerca de um quarto dos doentes sujeitos a quimioterapia acabam por desenvolver um estado de febre e neutropenia cuja causa mais grave é a presença de bacteriemia por bactérias multirresistentes. A percentagem de mortalidade associada a estes casos aumenta com o tempo até se iniciar terapia antibiótica, daí a necessidade de administrar precocemente uma antibioterapia empírica de espectro alargado. (Bonilla, Cuervo e Gómez, 2012)

A **procalcitonina**, em condições normais, é sintetizada maioritariamente pelas células C da glândula tiroideia e, em menor quantidade, pelas células neuroendócrinas pulmonares e intestinais. Um dos principais fenómenos que aumenta a produção de procalcitonina é o processo infeccioso bacteriano, que promove o aumento da sua síntese por parte dos monócitos, macrófagos e hepatócitos, estimulada pela produção de endotoxinas bacterianas. A procalcitonina é, portanto, um marcador preditivo de bacteriemia e do seu mau prognóstico. (Bonilla, Cuervo e Gómez, 2012)

Os valores aumentados de **bilirrubina** direta apoiam também a hipótese de lesão ao nível dos canalículos biliares, que impedem a sua eliminação eficaz.

#### Resultados microbiológicos:

- Hemoculturas (Colhidas a 6/5/2019): *Escherichia coli* selvagem
- Expetoração (Colhidas a 7, 8 e 9/5/2019): *Pseudomonas aeruginosa* multisensível e *Klebsiella pneumoniae* multirresistente, carbapenemase positiva.

**Tabela xvii** - Parâmetros de maior relevância, determinados a 17/05/2019.

Parâmetro	Resultado obtido	Intervalo de referência
Leucócitos	<b>46,0</b>	4,0 – 10,0 ( $\times 10^9/L$ )
Velocidade de sedimentação	<b>59</b>	0 a 20 mm/h
Proteínas totais	<b>4,6</b>	6 a 7,8 g/dL
Albumina	<b>2,1</b>	3,5 a 5,5 g/dL
Bilirrubina total	<b>0,8</b>	0,3 a 1,2 mg/dL/dia
Alanina aminotraseferase (ALT)	<b>56</b>	0 a 35 U/L
Gama-GT (GGT)	<b>1663</b>	8 a 78 U/L
Lactato desidrogenase (LDH)	<b>1179</b>	60 a 160 U/L
Proteína C reativa	<b>15,3</b>	0 a 0,8 mg/dL

A **velocidade de sedimentação** é, tal como a proteína C reativa, um marcador inflamatório. (Silva, Araújo e Frizzo, 2015)

O doente acabou por falecer. As suas últimas análises estão apresentadas na Tabela xvii.

As patologias onco-hematológicas têm a capacidade de afetar de diferentes formas o funcionamento da medula óssea e órgãos linfoides, alterando a produção e a função das células hematopoiéticas. Uma das consequências deste fenómeno é uma redução granulocítica, o que contribui para o aumento do risco de o doente vir a desenvolver infeções. (Limas e Minetto, 2014) Outro fator que contribui também para o aumento do risco de contração de infeções nestes pacientes é a terapia associada a estas patologias. Apesar do principal objetivo da quimioterapia consistir na destruição das células neoplásicas,

a maioria dos agentes utilizados neste tipo de tratamento atua de forma não específica, lesando também as células normais do doente, de entre as quais, as células do sistema imunológico. Esta destruição celular explica também o desenvolvimento de um estado de imunossupressão por parte do doente, a sua maior propensão para a contração de infeções e a maior dificuldade em combatê-las. (Silva, Araújo e Frizzo, 2015) Adicionalmente, os doentes imunossuprimidos internados e, portanto, expostos ao ambiente hospitalar, como é o caso do doente em questão, estão ainda submetidos a riscos adicionais que contribuem para a contração de infeções, nomeadamente, punções venosas e procedimentos invasivos. Esta situação é agravada pela severidade das infeções nosocomiais, que têm muitas vezes como agente etiológico um microrganismo multirresistente. (Limas e Minetto, 2014)

Todos estes fatores contribuem então para agravar o risco de infeção neste tipo de doentes, assim como para dificultar o seu tratamento, o que explica o facto das patologias infecciosas contribuírem para uma elevada morbilidade e mortalidade no doente oncológico. (Aliberti *et al.*, 2009)

## Conclusão

O estágio descrito pelo presente relatório permitiu rever conhecimentos e aplicá-los ao contexto de um laboratório hospitalar, bem como a aprendizagem de muitos mais. Proporcionou uma melhor visão do que é de facto o trabalho num laboratório de análises clínicas e a sua importância no diagnóstico e seguimento de doentes.

Relativamente à passagem pelo Setor de Hematologia, considero que me permitiu melhorar significativamente aspetos como a observação e a interpretação de esfregaços sanguíneos, assim como construir uma avaliação crítica dos resultados obtidos para os vários parâmetros. Tive ainda a oportunidade de acompanhar a realização de análises imunofenotípicas por citometria de fluxo, um método de análise que me despertou bastante interesse.

No Setor de Microbiologia desenvolvi capacidades técnicas e relativas à interpretação de crescimento microbiano numa variedade de produtos biológicos, tendo em conta o contexto clínico do doente. A passagem por este setor alertou-me especialmente para o peso das infeções na morbilidade e mortalidade associadas aos doentes oncológicos.

Apesar das valências escolhidas, que correspondem de facto àquelas que me despertam especial interesse, creio que também desenvolvi conhecimentos relativamente às áreas de Imunologia e Bioquímica, assim como um maior interesse, com destaque para as análises efetuadas por eletroforese em gel de agarose, e para a validação e interpretação de resultados, respetivamente.



# Referências

- ABDELRAOUF A. ELMANAMA, 2007 - Diagnostic Medical Microbiology. (2007).
- ABORD, A. A. *et al.* - Diagnóstico E Tratamento De Itu. **Rev Assoc Med Bras.** 49:1 (2003) 109-16.
- AHMAD, Shilan S.; ALI, Fattma A. - Microbiological Study of Pathogens Isolated From Women with Genital Tract Infection. 01:02 (2015) 95-105.
- AKANNI, E. O.; PALINI, A. - Immunophenotyping of Peripheral Blood and Bone Marrow Cells by Flow Cytometry. **Ejifcc.** . ISSN 1650-3414. 17:1 (2006) 17-21.
- ALIBERTI, S. *et al.* - O papel da neutropenia no prognóstico do doente oncológico com pneumonia adquirida na comunidade. **Revista Portuguesa de Pneumologia (English Edition).** . ISSN 21735115. 15:4 (2009) 736-739. doi: 10.1016/s2173-5115(09)70148-4.
- ALMEIDA, José Ricardo Chamhum De *et al.* - Marcadores Tumorais: Revisão de Literatura. **American Printer.** . ISSN 07446616. 53:MAR. (2007) 305-316.
- ANDRIOLO, Adagmar *et al.* - **Coleta e Preparo da Amostra Biológica.** ISBN 9788578681395.
- ANVISA, Agência Nacional De Vigilância Sanitária - Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde.** . ISSN 1618-0607. 7:2 (2004) 24. doi: 10.2190/F8PB-HGJH-FHA8-6KH9.
- ARAÚJO, Maria Rita Elmor De - Hemoculturas -Recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados Coleta de hemoculturas. **Journal Infect Control.** . ISSN 23165324. 1:1 (2012) 8-19. doi: 10.1073/pnas.1104651108.
- BANDEIRA, Ricardo; MAGALHÃES, Andressa Figueiredo; AQUINO, Hugo Bastos Da Silva De - Interpretação dos critérios de liberação dos resultados de hemograma através de contadores automatizados em laboratório de urgência. **Revista Saúde e Pesquisa.** 7:3 (2014) 403-408.
- BARBEDO, Leonardo S.; SGARBI, Diana BG - Candidíase. 22:1 (2010) 22-38.
- BARROSO, Ana; CAMPOS, Paula; GRUMETE, Helena - Exames auxiliares de diagnóstico em pneumologia oncológica. (2007).

BARTLEY, Paul A. *et al.* - A DNA real-time quantitative PCR method suitable for routine monitoring of low levels of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. **Journal of Molecular Diagnostics**. . ISSN 19437811. 17:2 (2015) 185-192. doi: 10.1016/j.jmoldx.2014.10.002.

BASQUES, José Carlos - Usando controles no laboratório clínico. (2009) 55.

BAÚ, Denise; SIQUEIRA, Márcia Ruth; MOOZ, Ednéia Dotti - Salmonella-Agente Epidemiológico Causador De Infecções Alimentares: Uma Revisão. **Xx Congresso Brasileiro De Economia Doméstica, Viii Encontro Latino Americano De Economia Doméstica; I Encontro Intercontinental De Economia Doméstica**. (2009) 1-10.

BHAT, Sevitha; DEVI, Nilica; SHENOY, Shalini - Microbiological Profile of Vaginal Swabs. **Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences**. . ISSN 22784748. 1:4 (2013) 509-513. doi: 10.14260/jemds/80.

BHATTACHARJEE, Prithwiraj *et al.* - Glimpse Into the Hidden Aspects of Urinary Tract Infection in Patients With Diabetes Mellitus and Prostatomegaly. **Journal of Evidence Based Medicine and Healthcare**. . ISSN 23492562. 3:13 (2017) 433-438. doi: 10.18410/jebmh/2016/101.

BLAYA, Carolina *et al.* - Análise da utilização dos novos inibidores da trombina na prática médica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. . ISSN 0066-782X. 71:2 (1998) 163-167. doi: 10.1590/s0066-782x1998000800013.

BLEEKER, Jonathan S.; HOGAN, William J. - Thrombocytosis: Diagnostic Evaluation, Thrombotic Risk Stratification, and Risk-Based Management Strategies. **Thrombosis**. . ISSN 2090-1488. 2011:August 2014 (2011) 1-16. doi: 10.1155/2011/536062.

BOLLMANN, Patricia Weinschenker; GIGLIO, Auro Del - Leucemia mieloide crônica: passado, presente, futuro. **Einstein (São Paulo)**. . ISSN 1679-4508. 9:2 (2011) 236-243. doi: 10.1590/s1679-45082011rb2022.

BONILLA, Diego Andrés; CUERVO, Sonia Isabel; GÓMEZ, Julio César - Utilidad de la procalcitonina en pacientes adultos con neoplasias hematológicas y neutropenia febril posquimioterapia. Estado del arte. **Infectio**. . ISSN 01239392. 16:4 (2012) 223-229. doi: 10.1016/s0123-9392(12)70017-6.

BOUZA, Emilio; LIÑARES, Josefina; PASCUAL, Álvaro - **Procedimientos en**

**Microbiología Clínica.** ISBN 8460922901.

BROOKS, Geo. F. *et al.* - **Microbiologia médica.** Twenty six ed.: Artmed, (2014). ISBN 978-85-8055-335-2.

BROWN, M.; WITTWER, C. - Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. **Clinical chemistry.** . ISSN 0009-9147. 46:8 Pt 2 (2000) 1221-9.

CANÇADO, Rodolfo D.; CHIATTONE, Carlos S. - Anemia de Doença Crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.** . ISSN 1516-8484. 24:2 (2002) 127-136. doi: 10.1590/S1516-84842002000200009.

CARLOS, Maria Marília Leite; FREITAS, Polyanna Dantas Fernandes De Sousa - Estudo Da Cascata De Coagulação Sangüínea E Seus Valores De Referência. **Acta Veterinaria Brasilica.** 1:2 (2007) 49-55.

CARVALHO, Wânia Da Silva *et al.* - Diagnóstico de resistência do Mycobacterium tuberculosis à rifampicina utilizando-se da reação em cadeia da polimerase. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** . ISSN 1516-9332. 43:1 (2007) 31-38. doi: 10.1590/s1516-93322007000100004.

CHAKR, Rafael Mendonça Da Silva; ALEGRETTI, Ana Paula - Velocidade de sedimentação globular (VSG): informações úteis para o dia a dia. **Clinical & Biomedical Research.** . ISSN 2357-9730. 31:3 (2011) 390-391.

CHIUSO, Fernanda; FERRARI, Iracema Carvalho; SANTOS, Izoete Aparecida Thomazini - Avaliação do desempenho dos reagentes do tempo de tromboplastina parcial ativada utilizados para detectar o anticoagulante lúpico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.** 41:3 (2005) 159-164. doi: 10.1590/s1676-24442005000300004.

COLLEONI, Gisele W. B. *et al.* - Linfomas: diagnóstico e tratamento. **InfectologiaHoje.** (2009).

CONITEC - Rituximabe para o tratamento de Linfoma Não Hodgkin de células B, Folicular, CD20 positivo, não tratado previamente em combinação com quimioterapia. (2016) 1-18.

CORADI, Silvana Torossian; GONÇALVES, Giovanna Cazarin; GONÇALVES, Maria Rosemei Cazarin - ACT. Identificação de leveduras do gênero Candida em amostras de urina, diferenciando estágios de colonização e infecção. (2017) 1-7.

COSTA, André Nathan *et al.* - The pulmonary microbiome: challenges of a new paradigm.

**Jornal Brasileiro de Pneumologia.** . ISSN 1806-3713. 44:5 (2018) 424-432. doi: 10.1590/s1806-37562017000000209.

CRISPIM, Gildemar José Bezerra; OLIVEIRA, Vinicius Marques - Principais Bactérias de Interesse Médico Encontrados em Molhos e Condimentos de Lanchonetes Tipo Fast Food. e **Ciência: C. Biológicas, Agrárias e ....** (2014) 115-124.

CUNHA, Fernanda De Paula *et al.* - Shigella sp: UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA. **Higiene Alimentar.** 21:264/265 (2017) 52-57.

CURTIS, Carl A. *et al.* - **Tietz - Fundamentals of clinical chemistry.** ISBN 9780721638652.

DESPOMMIER, Dickson D. *et al.* - **Parasitic diseases** Disponível em <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780702028625500441>. ISBN 9780997840001.

DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE - Norma da Direção-Geral da Saúde: Prescrição e determinação do hemograma. **Norma da Direção-Geral da Saúde: Prescrição e determinação do hemograma.** 2011:Anexo IV (2013) 1-13.

DRYDEN, Matthew S. - Complicated skin and soft tissue infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** . ISSN 03057453. 65:SUPPL. 3 (2010) 35-44. doi: 10.1093/jac/dkq302.

EASL - Recomendações de Orientação Clínica da EASL: Abordagem de doenças hepáticas colestáticas. **Journal of Hepatology.** 51:(2009) 237-267.

ESPOSITO, Silvano *et al.* - Diagnosis and management of skin and soft-tissue infections (SSTI). A literature review and consensus statement: an update. **Journal of Chemotherapy.** . ISSN 19739478. 29:4 (2017) 197-214. doi: 10.1080/1120009X.2017.1311398.

EUCAST - **Clinical breakpoints and dosing of antibiotics** , atual. (2019). Disponível em [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/).

FALAY, Mesude; OZET, Gilsun - Immunophenotyping of chronic lymphocytic leukemia. **Clinical Laboratory.** . ISSN 14336510. 63:10 (2017) 1621-1626. doi: 10.7754/Clin.Lab.2017.170406.

FALCHI, Lorenzo *et al.* - The Value of Molecular Response in Chronic Myeloid Leukemia: The Present and the Future. **Myeloid Leukemia - Clinical Diagnosis and Treatment.**

May (2012). doi: 10.5772/26119.

FERNANDES, Sofia *et al.* - Sociedade Portuguesa de Pediatria Consensos e Recomendações: Protocolo de parasitoses intestinais. În **Acta Pediátrica Portuguesa**

FERNÁNDEZ, Fernando Alcaide *et al.* - **Procedimientos en Microbiología Clínica. Micobacterias** Disponível em <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia9a.pdf>. ISBN 8460970329.

FERRARI, Daniele *et al.* - Diagnóstico laboratorial de doenças bacterianas. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**. Ano VII:12 (2009) 12-16.

FLORES, Luis Adan *et al.* - Bactérias Termofílicas do Gênero Campylobacter em Suínos do Estado do Rio de Janeiro. **Vigilância Sanitária em Debate**. 2:1 (2014) 46-50. doi: 10.3395/vd.v2i1.68.

FONSECA, AB; SEBASTIÃO, C.; CARDOSO, FJ - Programa Nacional de Controlo de Infecção - Orientações Para a elaboração de um Manual de boas práticas em Bacteriologia. **Ministério da Saúde Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge**. (2004).

GOUVEIA, Gisele Rodrigues; SIQUEIRA, Sheila Aparecida Coelho; PEREIRA, Juliana - Pathophysiology and molecular aspects of diffuse large B-cell lymphoma. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. . ISSN 1516-8484. 34:6 (2012) 447-451. doi: 10.5581/1516-8484.20120111.

GUAREZE, Gabriela Massarotto; BORDIGNON, Jardel Cristiano - Estudo comparativo entre hemocultura automatizada e manual em um laboratório do sudoeste do Paraná , Brasil Comparative study of automated and manual blood. 48:18 (2018) 1-9.

GUERRA, André Fioravante - **Microbiologia de alimentos - Pesquisa de Salmonella sp.** 1ª ed. ISBN 9781450349185.

HAMID, Gamal Abdul - **Manual of Hematology**

HAMID, Gamal Abdul - Clinical Hematology. **Medicine & Science in Sports & Exercise**. . ISSN 0195-9131. 43:11 (2011a) 2219. doi: 10.1249/mss.0b013e318236abda.

HAMID, Gamal Abdul - Classification of Acute Leukemia. August (2011b). doi: 10.5772/19848.

HOFFBRAND, A. Victor; MOSS, Paul A. H. - **Hoffbrand's essencial haematology**. Sétima ed. ISBN 9781118408674.

IVANOVA, Krasimira - CARBAPENEMASES – TYPES AND DETECTION. January 2014 (2014).

KAYSER, Fritz H. *et al.* - **Medical Microbiology**. : Thieme, (2005). ISBN 1-58890-245-5.

KHALLAFALLAH, Alhossain A.; MOHAMED, Muhajir - Nutritional Anaemia. February 2012 (2012) 414. doi: 10.5772/30613.

KLACK, Karin; CARVALHO, Jozélio Freire De - Vitamina K: metabolismo, fontes e interação com o anticoagulante varfarina TT - Vitamin K: metabolism, sources and interaction with the anticoagulant warfarin. **Revista Brasileira de Reumatologia**. . ISSN 0482-5004. 46:6 (2006) 398-406. doi: 10.1590/S0482-50042006000600007.

KOEPKE, John A. - Technologies for coagulation instruments. (2000) 27-30.

LANNA, Anna Cristina *et al.* - Atividade de urease no solo com feijoeiro influenciada pela cobertura vegetal e sistemas de plantio. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**. . ISSN 01000683. 34:6 (2010) 1933-1939.

LIMA, Máira Ferreira Pinto *et al.* - Staphylococcus aureus e as infecções hospitalares- Revisão de literatura. **Revista Uningá**. 21:1 (2015) 32-39.

LIMAS, Milena Fontes Silva; MINETTO, Rita De Cássia - Conhecimento de pacientes onco-hematológicos em tratamento quimioterápico sobre os cuidados para prevenção de infecções. **Comun. ciênc. saúde**. . ISSN 1980-0584. 25:1 (2014) 35-44.

LIU, Yang; BARTA, Stefan Klaus - Diffuse large B-cell lymphoma: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. **American Journal of Hematology**. . ISSN 10968652. 94:5 (2019) 604-616. doi: 10.1002/ajh.25460.

LOFTIS, Amanda D.; REEVES, Will K. - Principles of Real-Time PCR. **Veterinary PCR Diagnostics**. June (2012) 2-17. doi: 10.2174/97816080534831120101.

MACHADO, Ana Isabel; LIMA, Jorge - Trombofilias e Contracepção. 2:2 (2008) 1-3.

MACKIE, Ian J. *et al.* - GUIDELINES ON FIBRINOGEN ASSAYS. **British Journal of Haematology**. . ISSN 0007-1048. (2003) 396-404.

MANDAL, Ananya - Hematology Treatments. (2019) 1-3.

MARQUES, Patrícia Bentes; FERREIRA, Alcione Pena; CARNEIRO, Flavia Matilla Colares - Perfil bacteriano de cultura de ponta de cateter venoso central. **Revista Pan-Amazônica**

de **Saúde**. 2:1 (2011) 53-58. doi: 10.5123/s2176-62232011000100006.

MIOTTO, Nadiesca Maria Lazzari et al. - Métodos laboratoriais de identificação do fungo *Candida* sp. (2004) 27-33.

MONTEIRO, Leila - Valores de referência dos índices plaquetários e construção de algoritmo para liberação do plaquetograma. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. . ISSN 2448-3877. 49:3 (2017) 263-267. doi: 10.21877/2448-3877.201700531.

MOREAU, P. et al. - Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**. . ISSN 15698041. 28:April (2017) iv52-iv61. doi: 10.1093/annonc/mdx096.

MOTA, Carla Lopes Da; BEÇA, Helena Paula - Análise sumária de urina de rotina: porquê e para quê? **Revista Portuguesa de Clínica Geral**. 29:4 (2018) 244-248. doi: 10.32385/rpmgf.v29i4.11109.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. - **Microbiologia Médica**. : Elsevier Health Sciences Brazil, (2014). ISBN 9780874216561.

NADERI, Nadia; YANG, David T. - Lymphoplasmacytic lymphoma and waldenström macroglobulinemia. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**. . ISSN 00039985. 137:4 (2013) 580-585. doi: 10.5858/arpa.2012-0034-RS.

NAOUM, Flávio Augusto; NAOUM, Paulo Cesar - Hematologia Laboratorial - Eritrócitos. **Edição da Academia de Ciência e Tecnologia (AC&T) São José do Rio Preto - SP 2008**. (2008).

NETO, Osvaldo Merege Vieira - Infecção do tracto urinário. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**. . ISSN 2176-7262. 33:3 (2000) 219-231.

NODARI, Carolina Silva; BARTH, Afonso Luís - RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM ENTEROBACTÉRIAS: FOCO EM CARBAPENEMASES. (2016) 10-13.

NOGUEIRA, Rui Artur - Programa Nacional para as Doenças Oncológicas: o despacho n.º 8254/2017, de 21 de setembro, do Secretário de Estado Adjunto e da Saúde, merece mais atenção e representa um primeiro passo para a orientação de soluções. (2018) 104-109.

OLIVEIRA, Evelyn De et al. - ELETROFORESE: CONCEITOS E APLICAÇÕES. **Enciclopédia Biosfera**. 13:23 (2015) 1-26. doi: 10.18677/Enciclopedia.

PATNAIK, Mrinal M.; TEFFERI, Ayalew - Chronic myelomonocytic leukemia: 2018 update on

diagnosis, risk stratification and management. **American Journal of Hematology**. . ISSN 10968652. 93:6 (2018) 824-840. doi: 10.1002/ajh.25104.

PEREIRA, Rose Elisabeth Peres; PETRECHEN, Guilherme Grande - Principais métodos diagnósticos bacterianos. **Revista Científica eletrônica de medicina veterinária**. 16:1679-7353 (2011). doi: 16797353.

POZZOBON, Adriane - **BIOMEDICINA NA PRÁTICA: DA TEORIA À BANCADA**. ISBN 9788581672243.

PROVAN, Drew - **ABC OF CLINICAL HAEMATOLOGY** . Segunda ed. Disponível em <http://blood.xqhospital.com.cn:8050/uploadfile/2009/3/15/20090315080208.pdf>.

QAHTANI, Sultan Ayed Al - Drug-induced megaloblastic, aplastic, and hemolytic anemias: current concepts of pathophysiology and treatment. **Int J Clin Exp Med**. 11:6 (2018) 5501-5512.

QIAN, Qinfang; EICHELBERGER, Karen; KIRBY, James E. - Rapid identification of *Staphylococcus aureus* in blood cultures by use of the direct tube coagulase test. **Journal of Clinical Microbiology**. . ISSN 00951137. 45:7 (2007) 2267-2269. doi: 10.1128/JCM.00369-07.

RAHMAN, Heshu Sulaiman - Principles of Haematology Laboratory Manual. (2016).

REGO, Eduardo M.; SANTOS, Guilherme A. S. - Papel da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das pancitopenias e das linfocitoses. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. 31:55 16 (2009) 367-374. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842009005000081>.

REIS, Paulo Roberto De Melo *et al.* - Avaliação da determinação do tempo de protrombina em amostras de sangue colhidas por duas diferentes técnicas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. . ISSN 1676-2444. 41:4 (2005) 251-255. doi: 10.1590/S1676-24442005000400006.

ROCHA MIRANDA, Carolina Villela *et al.* - Síndrome de Sweet associada a linfoma de Hodgkin - Relato de caso. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. 86:5 (2011) 1016-1018.

RODRIGUES, Evandra - Novos conceitos sobre a fisiologia da hemostasia. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**. . ISSN 15170276. 10:1 (2012) 218-233. doi: 10.5892/ruvrv.2012.101.218233.

ROSENFELD, Ricardo - Hemograma. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. . ISSN 1676-2444. 48:4 (2012) 244-244. doi: 10.1590/s1676-24442012000400001.

SALESSE, Stephanie; VERFAILLIE, Catherine M. - BCR/ABL: from molecular mechanisms of leukemia induction to treatment of chronic myelogenous leukemia. **Oncogene**. . ISSN 0950-9232. 21:56 (2002) 8547-8559. doi: 10.1038/sj.onc.1206082.

SANTOS, Adriano Palhari Dos; JUNIOR, Gerson Zanusso - Controle de qualidade em laboratórios clínicos. 45:(2015) 60-67.

SANTOS, ANA PAULA CANDIDO DOS - **Avaliação da Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF) em cavidade oral e região de cabeça e pescoço em diferentes técnicas de coloração**

SANTOS, Isabel Cristina Alves Dos; SOUSA, Raimundo Vicente De; SANTANA, Gilcinéa De Cássia - Princípios da antibioticoterapia em medicina veterinária. (2014).

SANTOS, V. M. Dos; CUNHA, S. F. De C. Da; CUNHA, D. F. Da - Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações. **Revista da Associação Médica Brasileira**. 46:3 (2000). doi: 10.1590/s0104-42302000000300008.

SARAIVA, Ana Suely Leite *et al.* - **Manual de Diagnóstico Laboratorial das Coagulopatias Hereditárias e Plaquetopatias**

SATO, Andréa De Fátima *et al.* - Nitrito urinário e infecção do trato urinário por cocos gram-positivos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. 41:6 (2006) 397-404. doi: 10.1590/s1676-24442005000600005.

SERNA, Javier De La - Linfoma B difuso de células grandes - Información general sobre la enfermedad. (2011).

SILVA, Francielen Colet Da; ARAÚJO, Lucinea Da Silva; FRIZZO, Matias Nunes - NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS NO IDOSO : UMA REVISÃO. (2015).

SILVA, Marcio Roberto - Diagnóstico laboratorial da tuberculose : Revisão de literatura. 28:Supl 5 (2018) 197-206.

SILVA, Roberta Oliveira De Paula E; LOPES, Aline De Freitas; FARIA, Rosa Malena Delbone De - Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. 18:2 (2008) 116-122.

SILVEIRA, Alessandro Conrado De Oliveira; SOUZA, Helena Aguiar Peres Homem De Mello; ALBINI, Carlos Augusto - A Gardnerella vaginalis e as infecções do trato urinário. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. . ISSN 1676-2444. 46:4 (2010) 295-300. doi: 10.1590/s1676-24442010000400006.

SOARES, Anna L.; SANTOS, Elcivane A. - Velocidade de hemossedimentação: comparação entre o método Microtest X (microsedimentação) e o método de referência Westergren. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. 31:1 (2009) 47-48. doi: 10.1590/s1516-84842009000100014.

SOEDIONO, Budi - Micobactérias. **Journal of Chemical Information and Modeling**. . ISSN 1098-6596. 53:1989) 160. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.

THEML, H.; DIEM, H.; HAFERLACH, T. - **Color Atlas of Hematology Practical Microscopic and Clinical Diagnosis**. ISBN 3136731026.

THEOPHILO, Grace Nazareth Diogo *et al.* - **Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial de Campylobacter** Disponível em <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/09/manual-tecnico-diagnostico-laboratorial-campylobacter.pdf>. ISBN 978-85-334-1793-9.

TIMM, Lílian De L. - TÉCNICAS ROTINEIRAS DE PREPARAÇÃO E ANÁLISE DE LÂMINAS HISTOLÓGICAS. . ISSN 00977411. 2:(2005) 964-965.

TOMAZ, Ana Paula O. *et al.* - The detection of Bence Jones protein in urine by the heat test helps in diagnosis of multiple myeloma? **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. . ISSN 1676-2444. February (2017) 20-23. doi: 10.5935/1676-2444.20170006.

TRIPODI, Armando - D-dimer testing in laboratory practice. **Clinical Chemistry**. . ISSN 00099147. 57:9 (2011) 1256-1262. doi: 10.1373/clinchem.2011.166249.

VANPUTTE, Cinnamon; REGAN, Jennifer; RUSSO, Andrew - **Seeley's Essentials of Anatomy and Physiology**. 9ª Edição ed. ISBN 9780078097324.

VAVRICKA, Stephan R. *et al.* - Serum protein electrophoresis: An underused but very useful test. **Digestion**. . ISSN 00122823. 79:4 (2009) 203-210. doi: 10.1159/000212077.

VESPERO, Eliana Carolina *et al.* - Correlação entre critérios clínicos e critérios laboratoriais no diagnóstico de vaginose bacteriana. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**. . ISSN 1676-5435. 20:2 (1999) 57. doi: 10.5433/1679-0367.1999v20n2p57.

VIDIGAL, Pedrina Gonçalves; SVIDZINSKI, Terezinha Inez Estivalet - Leveduras nos tratos urinário e respiratório: infecção fúngica ou não? **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. 45:1 (2009) 55-64. doi: 10.1590/s1676-24442009000100009.

VUYE, A.; PIJCK, J. - Urease Activity. **Methods to Determine Enzymatic Activity**. 26:6 (2013) 292-319. doi: 10.2174/9781608053001113010017.

WESCOR - Informações Essenciais para Aerospray Hematology Slide Stainer/Cytocentrifuge (Modelo 7150) (Colorador de Lâminas de Hematologia/Citocentrífuga), respectivos Acessórios e Suprimentos. Modelo 7150 (2009) 1-31.

WILDNER, Letícia Muraro *et al.* - MICOBACTÉRIAS: EPIDEMIOLOGIA E DIAGNÓSTICO. 40:3 (2011) 207-229.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) - O uso clínico de sangue. 53:(2013) 9-172.

XU, Dongsheng - Clinical Applications of Leukocyte Morphological Parameters. (2015) 2-5.

YAMASAKI, MARCELO - PRINCIPAIS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DAS CÉLULAS HEMOPOÉTICAS NAS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS. (2005) 2005.

YANG, By Chin S. - Microscopic Examination of Sticky Tape or Bulk Samples for the Evaluation and Identification of. (2003) 5-7.

ZURITA, Jeannete; MEJÍA, Carlos; BLANCO, Manuel Guzmán- - Diagnóstico e teste de sensibilidade para *Staphylococcus aureus* resistente à metilina na América Latina. (2010) 97-107.



# Anexos

## ➤ **Técnicas de coloração realizadas no Setor de Microbiologia**

### Técnica de coloração de Gram:

- 1º - Aplicar à amostra em lâmina o primeiro corante, violeta de genciana, durante 1 minuto;
- 2º - Desprezar o excesso de corante e aplicar soluto de lugol por 30 segundos;
- 3º - Aplicar o diferenciador de álcool-acetona gota-a-gota até descorar;
- 4º - Lavar em água corrente;
- 5º - Aplicar o segundo corante, fucsina diluída, e deixar atuar por 30 segundos;
- 6º - Lavar em água corrente e secar.

### Técnica de Kinyoun:

- 1º - Aplicar à amostra em lâmina o primeiro corante, carbolfucsina, durante 4 minutos;
- 2º - Lavar em água corrente;
- 3º - Aplicar o diferenciador à base de etanol e HCl (ácido clorídrico) por 5 segundos;
- 4º - Lavar em água corrente;
- 5º - Aplicar o segundo corante, verde-brilhante, e deixar atuar por 30 segundos;
- 6ª – Lavar em água corrente e secar.

### Composição dos reagentes para coloração:

#### **Soluto de lugol:**

- 3 gramas de iodo
- 6 gramas de iodeto de potássio
- água destilada

Misturar muito bem, num almofariz, o iodo e o iodeto de potássio. Adicionar água destilada até perfazer 1 litro de solução.

**Diferenciador álcool-acetona:**

- 1600 cc de álcool etílico a 95%
- 400 cc de acetona

A solução fica pronta a usar após a adição de ambos os volumes.

**Diferenciador para coloração de Kinyoun:**

- 3 mL de HCl concentrado
- 97 mL de etanol 96%

➤ **Classificação e composição dos meios de crescimento utilizados no Setor de Microbiologia**

Os **meios de cultura** constituem uma importante ferramenta para a análise microbiológica dos vários produtos biológicos e são classificados em líquidos, sólidos (1,5% de agar) ou semi-sólidos (0,5% de agar). Estes meios, consoante a sua influência no crescimento dos microrganismos neles semeados, podem ainda ser divididos em 3 grupos: seletivos, diferenciais ou enriquecidos. Os meios seletivos, devido à sua composição, inibem seletivamente o crescimento de alguns microrganismos; os diferenciais possuem determinados constituintes que atuam como um indicador, permitindo diferenciar alguns microrganismos consoante as reações bioquímicas específicas por eles realizadas; e por fim, os meios enriquecidos têm na sua composição elementos altamente nutritivos que promovem o crescimento de microrganismos fastidiosos. (Fonseca, Sebastião e Cardoso, 2004)

Na Tabela xviii encontram-se apresentados todos os meios de crescimento utilizados no decorrer do presente estágio, bem como as respetivas classificações e composições.

**Tabela xviii** - Apresentação de todos os meios de crescimento utilizados no Setor de Microbiologia do IPO de Coimbra e respetiva classificação e composição.

Meio de crescimento	Classificação/Composição
BHI	Caldo de enriquecimento Composto por uma infusão de cérebro e coração de vitela
CLED	Meio sólido diferencial Contêm lactose e azul de bromotimol
CNA	Meio sólido seletivo Contêm colistina e ácido nalidíxico
COS	Meio sólido de enriquecimento e diferencial Tem na sua composição sangue desfibrinado
GN	Caldo de enriquecimento Contêm citrato, deoxicolato e manitol
HEK	Meio sólido seletivo e diferencial Contêm sais biliares
KCS	Caldo de enriquecimento Composto por meio Schaedler e vitamina k3
Löwenstein-Jensen	Meio sólido enriquecido e seletivo Contêm glicerol, verde malaquite e aspargina
MH	Meio sólido enriquecido para realização de antibiogramas Contêm nutrientes que permitem o crescimento de microrganismos
PVX	Meio sólido de enriquecimento Tem na sua composição sangue cozido
Sabouraud	Meio sólido seletivo Tem um ph ácido, uma alta concentração de glicose e antibacterianos
SCS	Meio sólido de enriquecimento Contêm sangue, menadiona e hemina
Selenito-F	Caldo seletivo Contêm selenito de sódio
XLD	Meio sólido seletivo e diferencial Contêm xilose, lisina e desoxicolato

### ➤ Testes bioquímicos para a identificação presuntiva de microrganismos

#### Teste da catalase

Com o auxílio de uma ansa, transfere-se uma colónia suspeita do meio de crescimento para uma lâmina, onde se fricciona a amostra de modo a obter um esfregaço. Sobre esta preparação, coloca-se uma gota de peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3% (v/v). A formação de bolhas de ar pelo contacto da colónia com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indica a positividade da amostra. (Fonseca, Sebastião e Cardoso, 2004)



Este teste é utilizado em laboratório para a distinção entre *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., sendo que, se positivo, indica a presença de microrganismos do primeiro género mencionado. (Fonseca, Sebastião e Cardoso, 2004)

### **Teste da coagulase**

Neste teste, é elaborada uma suspensão bacteriana pela adição das colónias em estudo a um tubo com plasma. A coagulase produzida por certos cocos Gram-positivo, como é o caso de *Staphylococcus aureus*, converte o fibrinogénio em fibrina insolúvel quando na presença de plasma, o que conduz, portanto, à formação de um coágulo após um período de incubação de 24 horas à temperatura de 37°C. (Zurita, Mejía e Blanco, 2010)

### **Teste da filamentação**

Em laboratório, recorre-se a este teste para a identificação do fungo *Candida albicans*. A sua execução passa pela elaboração de uma suspensão obtida a partir de colónias isoladas em estudo e soro. Esta espécie de fungo tem a capacidade de produzir tubos germinativos, nestas condições, após um período de incubação de 4 horas à temperatura de 37°C. (Miotto *et al.*, 2004)

### **Teste da oxidase**

O teste da oxidase baseia-se na produção intracelular da enzima oxidase por parte da bactéria. Para a sua realização, utilizam-se tiras comerciais impregnadas com o reagente N,N,N,N-tetrametil-p-fenileno diamina mono-hidrocloridrato, onde se fricciona uma fração de uma colónia pura em estudo. Na presença de enzima oxidase, ou seja, nos casos positivos, pode observar-se o aparecimento de cor roxa, enquanto nos casos negativos a tira adquire uma tonalidade amarela ou não ocorre qualquer mudança de cor. Este teste é útil para a distinção entre bactérias da família *Enterobacteriaceae* (oxidase negativas) de outras famílias de bactérias, como as *Pseudomonadaceae*. O aparecimento de cor justifica-se pela oxidação, por parte da enzima citocromo-oxidase, do aceitador final de eletrões que neste teste é substituído por um substrato artificial, um composto cromogénico que, quando oxidado, apresenta cor roxa. (Crispim e Oliveira, 2014)

### Teste da urease

A enzima urease catalisa a hidrólise de ureia em CO<sub>2</sub> e amónia. Para a realização do teste de pesquisa desta enzima é necessário transferir uma porção de colónia em estudo para um caldo que contenha ureia na sua composição e um indicador de pH, nomeadamente, vermelho de fenol. Na presença da enzima urease ocorre um processo de alcalinização devido há libertação de amónia e o meio adquire uma cor rosa forte. Caso não se verifique alteração da cor do meio, o teste é considerado negativo. Este teste é útil para a diferenciação entre Enterobactérias oxidase positivas e oxidase negativas. (Lanna *et al.*, 2010)

## ➤ **Técnicas de sementeira para meios sólidos em placa utilizadas no Setor de Microbiologia**

### Técnica de sementeira quantitativa

Técnica utilizada para o cultivo de amostras de urina. Nesta técnica recorre-se a uma ansa calibrada, de 10µL, para semear a amostra no meio sólido. Com a ansa carregada é delineada uma linha correspondente ao diâmetro da placa, a partir da qual o produto é espalhado lateralmente pela superfície da placa.

### Técnica de esgotamento do produto por extensão à superfície do meio sólido

Técnica utilizada para o isolamento de microrganismos. As placas são semeadas com uma ansa com inóculo que é descarregada num ponto periférico da placa, a partir do qual se começa a espalhar o produto, por quadrante, com estrias cada vez mais afastadas de modo a que se consigam obter colónias isoladas.

**Nota:** Sempre que, na descrição do cultivo de amostras, não é mencionada nenhuma das outras técnicas de sementeira, significa que se recorreu à técnica de sementeira por esgotamento do produto por extensão à superfície do meio sólido.

### Técnica de sementeira por inundação

Técnica utilizada para o cultivo de produtos líquidos. A placa é semeada com o auxílio de uma pipeta, de modo a que fique completamente coberta.

### **Técnica de sementeira em toalha**

Técnica utilizada para a realização de testes de suscetibilidade em placa. É efetuada com o auxílio de uma zaragatoa, previamente mergulhada na suspensão bacteriana em questão, que é de seguida aplicada ao meio de cultura. O objetivo desta técnica é cobrir toda a superfície do meio, garantindo uma distribuição uniforme do inóculo. Para tal, a placa é semeada em estrias apertadas em seis direções distintas, começando sempre a partir do centro da placa, e, por fim, a zaragatoa é rodada na periferia da placa.

## **➤ Técnicas de coloração utilizadas no Setor de Hematologia**

### **Coloração de Wright-Giemsa modificada**

Esta técnica de coloração, específica para células sanguíneas, cora de cor-de-rosa os eritrócitos e grânulos eosinofílicos, de púrpura os núcleos dos leucócitos e grânulos basofílicos e de azul o citoplasma dos monócitos e linfócitos. (Timm, 2005) Esta coloração é realizada de forma automatizada pelo aparelho Aerospray® 7150 Hematology Slide Stainer Centrifuge e tem como reagentes necessários: um fixador, um tampão, e os corantes eosina e tiazina. (WESCOR, 2009) A eosina é um ácido que cora as estruturas básicas das células de cor-de-rosa enquanto a tiazina é um corante básico que cora os componentes celulares ácidos de púrpura ou azul. (Timm, 2005) (SANTOS, 2014)

### **Coloração com azul de metileno:**

Esta técnica de coloração é realizada manualmente, através da adição do corante azul de metileno a 200µL de amostra. Esta preparação permanece em agitação durante 15 minutos antes da elaboração do esfregaço, que é observado em objetiva de imersão após secagem.

➤ **Valores de referência associados aos parâmetros determinados por Hemograma**

**Tabela xix** - Valores de referência associados aos vários parâmetros determinados pelo leucograma.  
Fonte: (Direção-Geral da Saúde, 2013)

Parâmetro (unidades)	Intervalo de referência
WBC ( $\times 10^9/L$ )	4,0 – 10,0
NEU ( $\times 10^9/L$ )	1,5 – 8,0
LYM ( $\times 10^9/L$ )	0,8 – 4,0
MONO ( $\times 10^9/L$ )	0,0 – 1,2
EOS ( $\times 10^9/L$ )	0,0 – 0,3
BASO ( $\times 10^9/L$ )	0,0 – 0,3

**Tabela xx** - Valores de referência associados aos vários parâmetros determinados pelo eritrograma.  
Fonte: (Direção-Geral da Saúde, 2013)

Parâmetro (unidades)	Intervalo de referência
RBC ( $\times 10^{12}/L$ )	4,31 – 6,40 (M)
	3,85 – 5,20 (F)
HGB (g/dL)	13,6 – 18,0 (M)
	11,5 – 16,0 (F)
HTC (%)	39,8 – 52,0 (M)
	34,7 – 46,0 (F)
MCV (fL)	80,0 – 97,0
MCH (pg)	26,0 – 34,0
MCHC (g/dL)	32,0 – 36,0
RDW (%)	11,5 – 15,0
Reticulócitos (%)	0,5 – 2,5
Reticulócitos ( $\times 10^9/L$ )	25 - 125

**Tabela xxi** - Valores de referência associados aos vários parâmetros determinados pelo plaquetograma.  
Fonte: (Direção-Geral da Saúde, 2013)

Parâmetro (unidades)	Intervalo de referência
PLT ( $\times 10^9/L$ )	140 – 440
MPV (fL)	6,5 – 12,4
PDW (%)	25,0 – 65,0

➤ **Valores de referência associados aos testes de coagulação sanguínea**

**Tabela xxii** - Valores de referência associados aos testes de avaliação da coagulação sanguínea.

<b>Parâmetro (unidades)</b>	<b>Intervalo de referência</b>
TP (s)	11 – 13
TTPA (s)	25 – 35
Fibrinogénio (mg/dL)	150 a 350
TT (s)	18,5 – 24
D-dímeros (µg/L)	≤ 300

➤ **Valores de referência de velocidade de sedimentação eritrocitária**

**Tabela xxiii** - Valor de referência associado à velocidade de sedimentação eritrocitária.

<b>Parâmetro (unidades)</b>	<b>Intervalo de referência</b>
VS (mm/h)	≤ 20