



UNIVERSIDADE DE  
COIMBRA

Carina Inês Fontinha Lopes

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO**  
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

**Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas  
orientado pela Professora Doutora Olga Maria Antunes Rodrigues Carvalho  
Cardoso e pelo Doutor Frederico Fernando Monteiro Marques Valido e  
apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra**

Outubro de 2020



Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

# **Relatório de Estágio**

## **Mestrado em Análises Clínicas**

**Carina Inês Fontinha Lopes**

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas orientado pela Professora Doutora Olga Maria Antunes Rodrigues Carvalho Cardoso e pelo Doutor Frederico Fernando Monteiro Marques Valido e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Estágio realizado no Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E. no período entre 2 de Dezembro de 2019 a 13 de Março e 15 de Junho a 14 de Agosto de 2020.

Abordagem a todas as áreas clínicas, com aprofundamento das valências de Microbiologia e Hematologia.

Outubro de 2020

1 2  9 0

UNIVERSIDADE D  
**COIMBRA**



*“... é saber que por trás de cada amostra biológica em exame  
há sorrisos, dor, resiliência e gratidão.”*

**Geraldo Ferrano**



## **Agradecimentos**

Ao Doutor Frederico Valido, diretor do Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG e meu orientador externo, e à Professora Doutora Ana Miguel Matos, coordenadora do Mestrado em Análises Clínicas, pela oportunidade na realização deste estágio bem como toda a orientação prestada ao longo destes meses.

À Professora Doutora Olga Cardoso, minha orientadora interna, pela sua disponibilidade e atenção no esclarecimento de dúvidas. Pelo tempo despendido na revisão do relatório e por todas as correções/sugestões de melhoria.

A toda a equipa do Serviço de Patologia Clínica, especialmente aos orientadores de cada Setor, ao Jorge Reis na Hematologia, à Maria Alexandre Mendes na Microbiologia, à Ana Catarina Fonseca na Química Clínica e ao Nuno Cunha, Sofia Carreiro e Jorge Pimenta na Imunologia, por me terem recebido tão bem e por todo o conhecimento transmitido.

Aos meus pais que sempre lutaram e trabalharam para que eu pudesse alcançar os meus objetivos. Pela força e apoio incondicional. Pela educação e valores que me transmitiram e que fazem de mim a pessoa que sou hoje. Para vocês, o meu maior e especial agradecimento.

Ao meu namorado Simão por ser o meu pilar. Por me motivar diariamente e me apoiar nas minhas decisões. Por todas as palavras de incentivo e pela paciência nos dias mais difíceis.

À Débora Cerqueira e à Cristiana Dias, duas grandes amigas que conheci neste mestrado e que levo comigo para a vida.

À Betânia Freitas que, mesmo longe fisicamente, me conseguiu sempre motivar e ajudar no que fosse preciso.

À Joana Marques e à Cláudia Silva que me acompanharam ao longo destes meses de estágio sempre com grande companheirismo.

E por fim, mas não menos importante, agradeço a todos os meus amigos e familiares mais próximos que, de uma maneira ou de outra, me apoiam e estão sempre comigo.





# Índice

Abreviaturas.....	xi
Índice de Figuras.....	xiii
Índice de Tabelas.....	xv
Resumo .....	xvii
<i>Abstract</i> .....	xvii
Capítulo I – Introdução .....	I
Capítulo II – Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG .....	2
2.1 – Fase Pré-Analítica .....	2
2.2 – Fase Analítica.....	3
2.2.1 – Setor de Hematologia.....	3
2.2.2 – Setor de Microbiologia .....	5
2.2.3 – Setor de Química Clínica .....	6
2.2.4 – Setor de Imunologia/Hormonologia.....	8
2.3 – Fase Pós-Analítica.....	10
2.4 – Controlo de Qualidade.....	10
Capítulo III – Microbiologia .....	11
3.1 – Processamento Laboratorial de Produtos Biológicos.....	12
3.1.1 – Sangue.....	12
3.1.2 – Secreções Respiratórias .....	16
3.1.3 – Exsudatos Purulentos Superficiais e Profundos .....	20
3.1.4 – Fezes .....	21
3.1.5 – Urina .....	25
3.1.6 – Ponta de Cateter .....	27
3.1.7 – Raspado de Fâneros .....	28
3.2 – Identificação Microbiana e Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana .....	29
3.2.1 – Testes Auxiliares à Identificação Microbiana.....	29
3.2.2 – Biologia Molecular .....	31

3.2.3 – Sistema de Identificação <i>BD BBL Crystal</i> .....	31
3.2.4 – <i>Vitek 2 Compact I5</i> : Identificação Definitiva e TSA .....	32
3.2.5 – TSA Manuais: Método de <i>Kirby-Bauer</i> e <i>E-test</i> .....	34
3.2.6 – Pesquisa de Mecanismos de Resistência: Beta-lactamases de Espectro Alargado e Carbapenemases .....	35
Capítulo IV – Hematologia .....	37
4.1 – Hemograma .....	38
4.1.1 – Parâmetros de Avaliação da Linha Eritrocitária .....	41
4.1.2 – Parâmetros de Avaliação da Linha Leucocitária .....	44
4.1.3 – Parâmetros de Avaliação da Linha Megacariocítica .....	45
4.2 – Velocidade de Sedimentação .....	46
4.3 – Esfregaço de Sangue Periférico .....	46
4.4 – Avaliação Laboratorial da Hemóstase .....	49
4.4.1 – Parâmetros de Rotina .....	50
4.4.2 – Detecção do Anticoagulante Lúpico .....	53
4.5 – Gene BCR-ABL .....	53
Capítulo V – Caso Clínico .....	55
Capítulo VI – Conclusão .....	59
Referências Bibliográficas .....	61

## Abreviaturas

<b>AL</b>	Anticoagulante Lúpico	<b>INSA</b>	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
<b>BAAR</b>	Bacilos Ácido-Álcool Resistentes	<b>INR</b>	<i>International Normalized Ratio</i>
<b>BCR</b>	<i>Breakpoint Cluster Region</i>	<b>IPOCFG</b>	Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil
<b>BHI</b>	<i>Brain Heart Infusion</i> Meio Líquido Infusão Cérebro Coração	<b>ISI</b>	<i>International Sensitivity Index</i>
<b>CHCM</b>	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média	<b>ITU</b>	Infeções do Trato Urinário
<b>CHUC</b>	Centro Hospitalar Universitário de Coimbra	<b>KCS</b>	Meio Líquido <i>Schaedler</i> com Vitamina k3
<b>CLED</b>	Gelose Cistina-Lactose-Deficiente em Eletrólitos	<b>LJ</b>	Gelose <i>Löwenstein Jensen</i>
<b>CMI</b>	Concentração Mínima Inibitória	<b>LMC</b>	Leucemia Mielóide Crónica
<b>CNA</b>	Gelose <i>Columbia</i> com Colistina e Ácido Nalidíxico com 5% de Sangue de Carneiro	<b>MGIT</b>	<i>Mycobacteria Growth Indicator Tube</i> Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias
<b>COS</b>	Gelose <i>Columbia</i> com 5% de Sangue de Carneiro	<b>MHE</b>	Gelose <i>Mueller-Hinton</i>
<b>CQE</b>	Controlo de Qualidade Externo	<b>MHF</b>	Gelose <i>Mueller-Hinton Fastidious</i>
<b>CQI</b>	Controlo de Qualidade Interno	<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> Reação de Polimerização em Cadeia
<b>dRVVT</b>	<i>Dilute Russell's Viper Venom Time</i> Tempo de Veneno de Víbora de <i>Russel</i> diluído	<b>PVX</b>	Gelose Chocolate com <i>PolyViteX</i>
<b>ESBL</b>	<i>Extended-Spectrum Beta-Lactamases</i> Beta-lactamases de Espectro Alargado	<b>RDW</b>	<i>Red Cell Distribution Width</i> Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos
<b>ESP</b>	Esfregaço de Sangue Periférico	<b>RIQAS</b>	<i>Randox International Quality Assessment Scheme</i>
<b>EUCAST</b>	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>	<b>SCS</b>	Gelose <i>Schaedler</i> com 5% de Sangue de Carneiro reduzida
<b>GN</b>	Meio Líquido <i>Gram Negative</i>	<b>SCT</b>	<i>Silica Clotting Time</i>
<b>HCM</b>	Hemoglobina Corpuscular Média	<b>SGC</b>	Gelose <i>Sabouraud</i> com Gentamicina e Cloranfenicol
<b>HEK</b>	Gelose <i>Hektoen</i>	<b>SPC</b>	Serviço de Patologia Clínica
<b>HU</b>	Hidroxiureia	<b>TE</b>	Trombocitémia Essencial
<b>HIL</b>	<i>Hemolysis, Icterus and Lipemia</i> Hemólise, Icterícia e Lipémia	<b>TP</b>	Tempo de Protrombina
<b>ID</b>	Testes de Identificação	<b>TSH</b>	Hormona Estimuladora da Tiróide
		<b>TSA</b>	Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

**TSDT** Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica

**TT** Tempo de Trombina

**TTPa** Tempo de Tromboplastina Parcialmente ativada

**UFC** Unidades Formadoras de Colônias

**VCM** Volume Corpuscular Médio

**VCS** *Volume-Conductivity-Scatter*  
Volume-Conductividade-Dispersão

**VS** Velocidade de Sedimentação

**XLD** Gelose Xilose-Lisina-Desoxicolato

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b>	Câmara de fluxo laminar do Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG .....	12
<b>Figura 2</b>	Frascos de hemocultura <i>BD Bactec</i> e respetivo equipamento <i>Bactec 9050</i> .....	13
<b>Figura 3</b>	Presença de $\beta$ -Hemólise em COS por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
<b>Figura 4</b>	Morfologia bacteriana e coloração de <i>Gram</i> .....	15
<b>Figura 5</b>	Coloração de <i>Gram</i> (x50) de uma expetoração representativa do grupo 5 dos critérios de <i>Murray-Washington</i> .....	17
<b>Figura 6</b>	<i>Neisseria meningitidis</i> isolada em PVX .....	17
<b>Figura 7</b>	Observação microscópica (x40) de <i>Penicillium</i> spp. – fungo filamentoso cosmopolita .....	18
<b>Figura 8</b>	Coloração de <i>Kinyoun</i> (x50) com presença de BAAR corados a vermelho .....	19
<b>Figura 9</b>	Colónias de micobactérias em meio LJ .....	20
<b>Figura 10</b>	Crescimento microbiano nos meios líquidos KCS e BHI .....	21
<b>Figura 11</b>	Meios de cultura XLD e HEK .....	23
<b>Figura 12</b>	Crescimento isolado de leveduras em HEK .....	24
<b>Figura 13</b>	Uroculturas em meio CLED .....	26
<b>Figura 14</b>	Teste da Urease .....	30
<b>Figura 15</b>	Sistema de Identificação <i>BD BBL Crystal</i> .....	32
<b>Figura 16</b>	Esquema utilizado no processo de identificação microbiana com respetivas cartas de ID e TSA .....	33
<b>Figura 17</b>	Colocação das cartas no respetivo equipamento <i>Vitek 2 Compact 15</i> da <i>BioMérieux</i> .....	34
<b>Figura 18</b>	Método <i>Kirby-Bauer</i> em placas de MHE .....	35
<b>Figura 19</b>	<i>E-test</i> em MHE .....	35
<b>Figura 20</b>	Pesquisa dos mecanismos de resistência, ESBL e carbapenemas, pelo método de difusão em disco em placa de MHE .....	36

<b>Figura 21</b>	Circuito geral das amostras biológicas mais recebidas na rotina laboratorial do Setor de Hematologia do SPC-IPOCFG .....	38
<b>Figura 22</b>	Auto-analisador <i>Beckman Coulter DxH900 Analyzer</i> .....	39
<b>Figura 23</b>	Analisador automático <i>Test 1 BCL ALI Fax</i> .....	46
<b>Figura 24</b>	Procedimento para execução de um esfregaço de sangue periférico .....	47
<b>Figura 25</b>	Equipamento <i>ACL TOP CTS 350 da Instrumentation Laboratory</i> .....	50
<b>Figura 26</b>	Representação esquemática das vias intrínseca, extrínseca e comum da cascata da coagulação e parâmetros laboratoriais subjacentes .....	50
<b>Figura 27</b>	Cromossoma de Filadélfia .....	54
<b>Figura 28</b>	Visualização microscópica do esfregaço de sangue periférico (objetiva de 50x) .....	56
<b>Figura 29</b>	Observação ao microscópio ótico (x100) do esfregaço sanguíneo com coloração de <i>Gram</i> da hemocultura .....	58

## Índice de Tabelas

<b>Tabela I</b>	Equipamentos e respectivas análises efetuadas no Setor de Hematologia SPC-IPOCFG .....	4
<b>Tabela II</b>	Equipamentos e respetiva função do Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG .....	5
<b>Tabela III</b>	Equipamentos e respectivas análises efetuadas no Setor de Química Clínica SPC-IPOCFG .....	7
<b>Tabela IV</b>	Equipamentos e respectivas análises efetuadas no Setor de Imunologia/Hormonologia SPC-IPOCFG .....	9
<b>Tabela V</b>	Procedimento para coloração de <i>Gram</i> utilizado no Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG .....	15
<b>Tabela VI</b>	Critérios de <i>Murray-Washington</i> .....	16
<b>Tabela VII</b>	Procedimento para coloração de <i>Kinyoun</i> utilizado no Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG .....	19
<b>Tabela VIII</b>	Interpretação dos esfregaços para pesquisa de BAAR por coloração de <i>Kinyoun</i> utilizada no Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG .....	19
<b>Tabela IX</b>	Testes de Biologia Molecular disponíveis no Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG .....	31
<b>Tabela X</b>	Parâmetros determinados no <i>Beckman Coulter DxH900 Analyzer</i> e sua descrição .....	40
<b>Tabela XI</b>	Exemplos de alterações morfológicas das células sanguíneas e sua descrição .....	48
<b>Tabela XII</b>	Caso Clínico: Resultados laboratoriais a 29/07/2020 .....	55
<b>Tabela XIII</b>	Caso Clínico: Resultados laboratoriais a 6/08/2020 .....	57





## **Resumo**

O presente relatório descreve as atividades desenvolvidas no estágio curricular decorrido no Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, durante o período de 6 meses. As análises clínicas constituem um dos mais importantes meios complementares para o diagnóstico e monitorização das doenças oncológicas. Neste sentido, o Serviço de Patologia Clínica juntamente com outros departamentos e serviços do IPOCFG visam proporcionar uma resposta mais eficiente, multidisciplinar e integrada naquelas que são as exigências deste tipo de cuidados de saúde. O relatório faz uma abordagem geral a todas as áreas clínicas, com aprofundamento das valências de Hematologia e Microbiologia, deixando claro que todas têm irrepreensível importância, pois cada uma fornece informações indispensáveis à avaliação clínica dos doentes.

**Palavras-Chave:** Análises Clínicas; Oncologia; Microbiologia; Hematologia.

## **Abstract**

*This report describes the activities developed during the curricular internship at the Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil within the scope of the Master's Degree of Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy in University of Coimbra, for 6 month period. Clinical analysis are one of the most important complementary means for the diagnosis and monitoring of oncological diseases. Thus, the Clinical Pathology Service together with other departments and services of IPOCFG aim to provide a more efficient, multidisciplinary and integrated response to those that are the requirements of this type of health care. The report makes a general approach to all clinical areas, with the deepening of Hematology and Microbiology areas, making it clear that all of them have irreproachable importance, since each one provides essential information for the clinical evaluation of patients.*

**Key-Words:** Clinical Analysis; Oncology; Microbiology; Hematology.



## Capítulo I – Introdução

*“Cancer lies dormant in all of us. Like all living organisms, our bodies are making defective cells all the time.”*

**David Servan-Schreiber** em *Anticancer: A New Way of Life*

O cancro, por si só, é um processo complexo em todos os aspetos. Surge a partir da proliferação anormal de células geneticamente alteradas e dependendo do tipo dessas células, origem/localização e grau de malignidade é possível classificá-lo. Todos os dias, em todo o mundo, milhões de pessoas lutam contra esta doença e as perspectivas para os próximos anos apontam para o aumento da sua prevalência. Cada vez mais a prevenção, o diagnóstico e tratamento precoce associados à investigação de terapêuticas mais eficazes, são ferramentas essenciais para combater as doenças oncológicas.

A prestação de cuidados de saúde a doentes oncológicos requer a intervenção de uma equipa multidisciplinar de profissionais de saúde e a complementaridade de diferentes tecnologias. Neste sentido, as análises clínicas têm um papel imprescindível pois constituem um dos meios complementares para o diagnóstico e monitorização das doenças do foro oncológico. Foi com sentido nesta responsabilidade que vivenciei o estágio curricular decorrido no Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (IPOCFG) no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, durante o período de 6 meses.

O presente relatório descreve todas as áreas laboratoriais por onde passei, com descrição geral das valências de Imunologia/Hormonologia e Química Clínica, e com aprofundamento das valências Microbiologia e Hematologia, deixando claro que todas estas têm irrepreensível importância, pois cada uma fornece informações indispensáveis à avaliação clínica destes doentes. O relatório está dividido em 6 capítulos, com início na apresentação e caracterização do laboratório de estágio seguida de descrição das atividades desenvolvidas, e com término na apresentação de um caso clínico e conclusões finais.

## Capítulo II – Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG

A 29 de Dezembro de 1927, o Professor Doutor Francisco Gentil vê um dos seus maiores sonhos concretizado – a inauguração do primeiro pavilhão daquele que viria a ser o primeiro Centro Regional de luta contra o cancro em Portugal. Desde então, foram criadas novas estruturas e modernizados não só espaços como equipamentos, sempre com o foco na melhoria dos cuidados de excelência prestados ao doente oncológico. Hoje em dia, o IPOCFG é uma unidade hospitalar de referência integrada no Serviço Nacional de Saúde que visa o diagnóstico, tratamento e *follow-up* de todos os doentes da Região Centro, com população estimada em dois milhões de habitantes. Todos os seus departamentos e serviços são complementares entre si, existindo uma forte comunicação que visa proporcionar uma resposta mais eficiente, multidisciplinar e integrada naquelas que são as exigências deste tipo de cuidados de saúde (IPO Coimbra).

O Serviço de Patologia Clínica (SPC) faz parte desta dinâmica, tendo um papel fulcral tanto no diagnóstico como no seguimento dos doentes. Este é dirigido pelo Doutor Frederico Fernando Monteiro Marques Valido, especialista em Patologia Clínica pela Ordem dos Médicos e apoiado por uma equipa de cerca de 35 elementos com diferentes formações desde Médicos Especialistas, Internos de Especialidade, Técnicos Superiores de Saúde (Farmacêuticos, Bioquímicos e Biólogos), Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica (TSDT), Pessoal Administrativo e Assistentes Auxiliares.

Em termos físicos, o laboratório situa-se no edifício da Oncologia Médica e Laboratórios (Piso 0) e é constituído por uma área administrativa, sala de espera, duas salas de colheitas e a área laboratorial que se divide em quatro setores: Hematologia, Microbiologia, Química Clínica e Imunologia/Hormonologia. O fluxo diário médio é de 300 utentes e todos os dias, o SPC preocupa-se em garantir a maior qualidade subjacente a todos os procedimentos do processo analítico desde o atendimento dos doentes até à chegada dos resultados analíticos ao clínico.

### 2.1 – Fase Pré-Analítica

A fase pré-analítica compreende todas as seguintes etapas que são anteriores à fase analítica, por ordem cronológica: requisição pelo clínico, atendimento e preparação do utente, colheita, transporte e triagem das amostras. O controlo da qualidade nesta fase é crucial, pois é a que apresenta maior prevalência de erros, com cerca de 46 a 68% dos erros totais do laboratório (Atay *et al.*, 2014). A maior parte devem-se a requisições incorretas, má

identificação das amostras, erros associados às colheitas como por exemplo, tubos errados, volume insuficiente, hemólise *in vitro* ou presença de coágulo, e mau acondicionamento e transporte das amostras. Qualquer erro nesta fase influencia decisivamente os resultados emitidos pelo laboratório, podendo levar não só a falsos diagnósticos como tratamentos inadequados (Ashakiran, Sumati e Murthy, 2011).

Tudo começa com a solicitação dos parâmetros analíticos por parte do médico no sistema informático. Quando o utente chega à secretaria, o pessoal administrativo confere os seus dados no sistema informático *Modulab (Werfen)*, regista e coloca “presença” no processo, iniciando assim o seu circuito no SPC. Para facilitar o fluxo de amostras no laboratório, a cada utente é atribuído um número de dia de nove algarismos com indicação da data da colheita seguida de número da amostra, como por exemplo, 200129196 (Ano-Mês-Dia-Número). Os TSDT recebem informação da presença do doente e preparam os tubos consoante as análises pedidas, colocando as etiquetas de identificação que contêm o número do dia e respetivo código de barras. Posto isto, o doente aguarda na sala de espera a chamada do seu nome para entrar na sala de colheitas. Após a confirmação do nome e de ter a certeza que aquele utente corresponde àquela requisição, é que é efetuada a colheita de sangue. É de salientar que todas as colheitas sanguíneas dos doentes em ambulatório são da responsabilidade dos TSDT, incluindo as que são efetuadas no internamento. À saída da zona de colheitas, é a zona de receção e triagem das amostras. Aqui, para além de amostras de sangue, são também rececionadas urinas, fezes e expetorações. A triagem é feita por uma assistente auxiliar que faz chegar as amostras ao respetivo setor.

## **2.2 – Fase Analítica**

A fase analítica corresponde à realização das análises propriamente ditas, na qual se incluem a manutenção dos equipamentos, controlo da qualidade, calibrações e processamento da amostra até à obtenção de um resultado. Assim que a amostra chega ao setor, dá-se a sua entrada no sistema informático para poder ser processada.

### **2.2.1 – Setor de Hematologia**

O Setor de Hematologia está sob a orientação da Doutora Joana Diamantino, Médica Assistente Graduada e Especialista em Patologia Clínica. São realizadas várias análises a fim de identificar e monitorizar doenças hematológicas com base no estudo dos componentes sanguíneos. Sangue total, plasma e aspirados de medula óssea, são as amostras predominantes. Na Tabela I estão descritos todos os equipamentos bem como a sua função e respetivos

parâmetros analisados. Para além destes, outros equipamentos que fazem parte da rotina são: um agitador de tubos, um microscópio ótico, um contador de células, duas centrífugas, um vórtex, dois frigoríficos e cinco computadores.

Tabela I – Equipamentos e respetivas análises efetuadas no Setor de Hematologia SPC-IPOCFG.

Equipamentos (quantidade)	Função	Amostras	Parâmetros
<i>DxH900 Analyzer</i> <b>Beckman Coulter</b> (2)	Auto-analisador para Hemograma e Contagem de Reticulócitos	Sangue total (sangue venoso colhido para tudo com EDTA-K3)	Leucócitos Neutrófilos Linfócitos Monócitos Eosinófilos Basófilos Eritrócitos Hemoglobina Plaquetas Reticulócitos Hematócrito Volume Corpuscular Médio (VCM) Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) <i>Red Cell Distribution Width</i> (RDW)
<i>Test / BCL</i> <b>ALI Fax</b> (2)	Velocidade de Sedimentação Globular	Sangue total (sangue venoso colhido para tudo com EDTA-K3)	Velocidade de Sedimentação (VS)
<i>Aerospray</i> <i>HematologyPro</i> <b>Wescor</b> (1)	Coloração de Esfregaços	Sangue total e Aspirados de Medula Óssea	Morfologia e Contagem de Células
<i>ACL TOP CTS 350</i> <b>Instrumentation</b> <b>Laboratory</b> (2)	Estudos da Hemóstase	Plasma (sangue venoso colhido para tudo com Citrato de Sódio)	Tempo de Tromboplastina Parcialmente ativado (TTPa) Tempo de Protrombina (TP) <i>International Normalized Ratio</i> (INR) Tempo de Trombina (TT) Fibrinogénio D-Dímeros Fatores da Coagulação Proteínas S e C Antitrombina
<i>Cytomics FC500</i> <b>Beckman Coulter</b> (1)	Estudos de Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo	Sangue, Aspirados de Medula Óssea, Biópsia de Gânglios Linfáticos	Não aplicável
<i>GeneXpert</i> <b>Cepheid</b> (1)	Estudos genéticos por reação de polimerase em cadeia (PCR) em tempo real	Sangue total (sangue venoso colhido para tudo com EDTA-K3)	Pesquisa e quantificação do gene BCR-ABL

De uma forma geral, durante a minha passagem neste Setor, participei no processamento das amostras, realizei esfregaços sanguíneos, observei-os ao microscópio ótico, analisei vários casos clínicos e acompanhei o controlo de qualidade. No Capítulo IV - Hematologia são abordadas, com maior profundidade, as atividades desenvolvidas.

### 2.2.2 – Setor de Microbiologia

O Setor de Microbiologia está sob a orientação da Doutora Maria Alexandre Mendes, Mestre em Ciências Farmacêuticas e Especialista em Análises Clínicas e Genética Humana pela Ordem dos Farmacêuticos. São realizadas análises bacteriológicas, micológicas, parasitológicas e micobacteriológicas a diversos produtos biológicos, no sentido de identificar a presença do microrganismo patogénico e obter o seu perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. As amostras recebidas são mais variadas em comparação com os restantes setores, desde sangue, urina, secreções respiratórias, fezes, exsudatos, pontas de cateter a fâneros. Destas, as mais requisitadas são sangue para hemoculturas e urinas. Para além das uroculturas, é aqui que é efetuada a sumária de urina e observação do sedimento por uma questão de logística do laboratório. A Microbiologia é ainda a área menos automatizada do SPC, no entanto, o Setor dispõe de alguns equipamentos que facilitam e agilizam a rotina de trabalho (Tabela II). Também possui quatro estufas com temperaturas reguladas a 25°C, 30°C e 37°C (com e sem dióxido de carbono), dois frigoríficos para armazenamento de amostras, reagentes e meios de cultura, uma centrífuga, um densitómetro, três microscópios óticos e dois computadores.

Tabela II – Equipamentos e respetiva função do Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG.

Equipamentos	Função
Câmara de fluxo de ar laminar, Modelo 1169, Classe II tipo 2B <b>Forma Scientific</b>	Atmosfera estéril e segura para manipulação de materiais biológicos
<i>Cobas u411</i> <b>Roche Diagnostics</b>	Analisador semi-automático para sumária da urina
<i>Miditron ST</i> <b>Mannheim Boehringer</b>	Contagem de elementos figurados no sedimento urinário
<i>Vitek 2 Compact 15</i> <b>BioMérieux</b>	Sistema automatizado para testes de identificação dos microrganismos (ID) e de suscetibilidade antimicrobiana (TSA)
<i>Bactec 9050 Blood Culture System</i> <b>BD</b>	Sistema automatizado para incubação e monitorização de hemoculturas
<i>GeneXpert</i> <b>Cepheid</b>	Sistema automático para deteção de DNA bacteriano/RNA viral por PCR em tempo real

Durante o estágio, tive a oportunidade de processar diversas amostras, incluindo execução de esfregaços, colorações, visualização ao microscópio ótico, sementeira de meios de cultura e de efetuar procedimentos envolvidos nos testes de identificação microbiana de suscetibilidade aos antimicrobianos. Para além desta componente mais prática, pude aplicar conhecimentos teóricos e aprender tantos outros, quando diariamente acompanhava a interpretação e validação dos resultados. No Capítulo III - Microbiologia estão descritas as atividades desenvolvidas neste Setor.

### 2.2.3 – Setor de Química Clínica

O Setor de Química Clínica está sob a orientação do Doutor Luís Nina, Médico Especialista em Patologia Clínica. As análises bioquímicas e metabólicas permitem a avaliação da função de determinados órgãos, tendo um papel importante no acompanhamento dos doentes.

Neste Setor, o tipo de amostra mais requisitado é o soro, que é obtido a partir de sangue total colhido para tubos com esferas de sílica favorecedoras da ativação da coagulação fisiológica, posteriormente centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos. O segundo tipo de amostra mais requisitado é sangue total que, a partir de sangue venoso, é colhido para uma seringa balanceada com anticoagulante heparina para determinação de cálcio ionizado. Para além destes, também são analisados outros produtos biológicos como: sangue total a partir de sangue venoso colhido para tudo com EDTA-K3 para quantificação de hemoglobina glicada, sangue total a partir de sangue arterial colhido para seringa balanceada com heparina para gasometria, urina ocasional ou de 24 horas e ainda outros fluídos tais como líquido cefalorraquidiano, ascítico e pleural. Na urina das 24 horas regista-se o seu volume e centrifuga-se uma alíquota. Depois da preparação prévia das amostras, é necessário confirmar se há interferentes antes de continuarem o seu percurso. No caso do soro, é necessário verificar se há formação de fibrina, pois esta interfere na aspiração da amostra por parte dos equipamentos. Verifica-se também se está hemolisado, icterico ou lipémico, sendo que o auto-analisador *Atellica CH Analyzer* da *Siemens* mede estas interferências através do índice *Hemolysis, Icterus and Lipemia* (HIL) e transmite-o juntamente com os outros parâmetros para sua avaliação na validação dos resultados. Posto isto, as amostras seguem a sua rota e consoante os parâmetros laboratoriais a determinar, entram no auto-analisador respetivo (Tabela III). Também são parte integrante do Setor os seguintes equipamentos: duas centrífugas, três frigoríficos, quatro computadores, um vórtex e um agitador. À medida que os parâmetros são determinados, os resultados são enviados para o *Modulab* para serem validados pelos médicos especialistas.

São ainda realizadas técnicas manuais de aglutinação baseadas na reação antigénio-anticorpo, cuja leitura é realizada de forma macroscópica. Faz-se a determinação qualitativa de fator reumatóide, de anticorpos contra *Brucella* spp., *Salmonella* spp. e *Rickettsia* spp., e de reaginas plasmáticas para *screening* de presença de *Treponema Pallidum*. Apesar de cada teste ter procedimentos específicos, de uma forma geral as amostras são positivas quando se



observa aglutinação, em comparação com os controlos positivo (com aglutinação) e negativo (sem aglutinação).

Tabela III – Equipamentos e respetivas análises efetuadas no Setor de Química Clínica SPC-IPOCFG.

Equipamentos (quantidade)	Função	Método de Análise	Parâmetros																																						
<i>Atellica CH Analyzer Siemens</i> (2)	Auto-Analisador para determinação dos vários parâmetros bioquímicos	Espetrofotometria e Potenciometria indireta (Ionograma)	<table border="0"> <tr> <td>Ácido Úrico</td> <td>Fosfatase Alcalina</td> </tr> <tr> <td>Albumina</td> <td>Fósforo</td> </tr> <tr> <td>Amilase</td> <td>Gama</td> </tr> <tr> <td>Amónia</td> <td>Glutamyltransferase</td> </tr> <tr> <td>Alanina</td> <td>Glicose</td> </tr> <tr> <td>Aminotransferase</td> <td>Hemoglobina Glicada</td> </tr> <tr> <td>Aspartato</td> <td>AIC</td> </tr> <tr> <td>Aminotransferase</td> <td>Lactato Desidrogenase</td> </tr> <tr> <td>Bilirrubina direta</td> <td>Lipase</td> </tr> <tr> <td>Bilirrubina total</td> <td>Magnésio</td> </tr> <tr> <td>Cálcio total</td> <td>Microalbumina</td> </tr> <tr> <td>Capacidade Total de fixação do Ferro</td> <td>Pré-Albumina</td> </tr> <tr> <td>Colesterol HDL</td> <td>Proteínas totais</td> </tr> <tr> <td>Colesterol LDL</td> <td>Triglicérideos</td> </tr> <tr> <td>Colesterol Total</td> <td>Ureia</td> </tr> <tr> <td>Creatina Cinase</td> <td><b>Ionograma</b></td> </tr> <tr> <td>Creatinina Ferro</td> <td>Cloro</td> </tr> <tr> <td>Fosfatase Ácida Total</td> <td>Potássio</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Sódio</td> </tr> </table>	Ácido Úrico	Fosfatase Alcalina	Albumina	Fósforo	Amilase	Gama	Amónia	Glutamyltransferase	Alanina	Glicose	Aminotransferase	Hemoglobina Glicada	Aspartato	AIC	Aminotransferase	Lactato Desidrogenase	Bilirrubina direta	Lipase	Bilirrubina total	Magnésio	Cálcio total	Microalbumina	Capacidade Total de fixação do Ferro	Pré-Albumina	Colesterol HDL	Proteínas totais	Colesterol LDL	Triglicérideos	Colesterol Total	Ureia	Creatina Cinase	<b>Ionograma</b>	Creatinina Ferro	Cloro	Fosfatase Ácida Total	Potássio		Sódio
Ácido Úrico	Fosfatase Alcalina																																								
Albumina	Fósforo																																								
Amilase	Gama																																								
Amónia	Glutamyltransferase																																								
Alanina	Glicose																																								
Aminotransferase	Hemoglobina Glicada																																								
Aspartato	AIC																																								
Aminotransferase	Lactato Desidrogenase																																								
Bilirrubina direta	Lipase																																								
Bilirrubina total	Magnésio																																								
Cálcio total	Microalbumina																																								
Capacidade Total de fixação do Ferro	Pré-Albumina																																								
Colesterol HDL	Proteínas totais																																								
Colesterol LDL	Triglicérideos																																								
Colesterol Total	Ureia																																								
Creatina Cinase	<b>Ionograma</b>																																								
Creatinina Ferro	Cloro																																								
Fosfatase Ácida Total	Potássio																																								
	Sódio																																								
<i>ABL 800 FLEX Radiometer Copenhagen</i> (3)	Analisador semi-automático para determinação de cálcio ionizado e gasometrias	Potenciometria e Amperometria	<table border="0"> <tr> <td><b>Equilíbrio Ácido-Base</b></td> <td><b>Eletrólitos</b></td> </tr> <tr> <td>pH</td> <td>Sódio</td> </tr> <tr> <td>pCO<sub>2</sub></td> <td>Potássio</td> </tr> <tr> <td>pO<sub>2</sub></td> <td>Cloro</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Cálcio</td> </tr> <tr> <td><b>Oximetria</b></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Hemoglobina</td> <td><b>Metabolitos</b></td> </tr> <tr> <td>Saturação de O<sub>2</sub></td> <td>Lactato</td> </tr> <tr> <td>Frações de Hemoglobina</td> <td>Glucose</td> </tr> </table>	<b>Equilíbrio Ácido-Base</b>	<b>Eletrólitos</b>	pH	Sódio	pCO <sub>2</sub>	Potássio	pO <sub>2</sub>	Cloro		Cálcio	<b>Oximetria</b>		Hemoglobina	<b>Metabolitos</b>	Saturação de O <sub>2</sub>	Lactato	Frações de Hemoglobina	Glucose																				
<b>Equilíbrio Ácido-Base</b>	<b>Eletrólitos</b>																																								
pH	Sódio																																								
pCO <sub>2</sub>	Potássio																																								
pO <sub>2</sub>	Cloro																																								
	Cálcio																																								
<b>Oximetria</b>																																									
Hemoglobina	<b>Metabolitos</b>																																								
Saturação de O <sub>2</sub>	Lactato																																								
Frações de Hemoglobina	Glucose																																								
<i>Rapidlab 1265 Siemens</i> (1)	Confirmação de resultados obtidos no <i>ABL 800 FLEX</i>																																								
<i>RapidChem Siemens</i> (1)	Confirmação de resultados de ionograma	Potenciometria direta	Sódio Potássio Cloro																																						
<i>Reflotron Roche Diagnostics</i> (1)	Confirmação rápida de resultados obtidos no <i>Atellica</i> por química seca	Refratometria	Os parâmetros necessários à confirmação																																						

É de referir que, para além de todo o acompanhamento no processamento das amostras, foi no Setor de Química Clínica que tive maior contacto com o controlo de qualidade. Neste sentido, participei ativamente nas questões e na rotina de trabalho que este proporciona, incluindo a leitura de cartas de *Levey-Jennings* consoante as regras de *Westgard*, passagem de controlos e realização de calibrações.

### 2.2.4 – Setor de Imunologia/Hormonologia

O Setor de Imunologia/Hormonologia está sob a orientação do Doutor Nuno Cunha, Licenciado em Bioquímica e Especialista em Análises Clínicas. A grande maioria dos parâmetros são determinados por técnicas de imunoensaio que têm por base a formação de complexos antigénio-anticorpo. Destes parâmetros fazem parte marcadores tumorais, marcadores cardíacos, hormonas, anticorpos/antigénios específicos, alguns fármacos e autoanticorpos. A sua deteção depende do parâmetro e do próprio equipamento, podendo ser utilizados métodos competitivos ou em *sandwich* com anticorpos/antigénios marcados ou ligados a enzimas. Na Tabela IV estão identificados os equipamentos e respetivas análises. Tratando-se de um hospital oncológico este Setor tem um papel determinante no diagnóstico, prognóstico e monitorização dos doentes pela avaliação dos marcadores tumorais.

À semelhança do Setor de Química Clínica, o soro é o tipo de amostra mais utilizado para a determinação dos parâmetros analíticos, sendo que os tubos de colheita utilizados são diferentes. Para a obtenção de soro, a colheita é realizada para um tubo sem anticoagulante com paredes revestidas de sílica e com gel que facilita a separação entre o soro e o sangue coagulado. Também são recebidas amostras de plasma (sangue total em tubo com EDTA-K3), urina pontual ou de 24 horas e, raramente, saliva para doseamento de cortisol livre. As amostras são centrifugadas numa centrífuga refrigerada, pois alguns parâmetros tais como paratormona, hormona adrenocorticotrófica e metanefrinas, têm de ser doseados a 6°-8°C de temperatura. Depois da centrifugação, as amostras são analisadas quanto à presença de interferentes e seguem o seu circuito por uma ordem específica, que está pré-definida na etiqueta de identificação da amostra consoante os testes a realizar. À medida que os parâmetros são determinados, os resultados são enviados para o *Modulab* para serem validados.

No Setor também são efetuadas técnicas eletroforéticas no analisador semi-automático *Hydrasys 2 (Sebia)* que inclui a realização de proteinograma, imunofixação para deteção de imunoglobulinas monoclonais, e eletroforese da hemoglobina. Também é realizado doseamento de fármacos no auto-analisador *Viva-E (Siemens)* para determinação das concentrações pico e vale. Apesar da maioria do trabalho laboratorial ser automatizado, ainda assim, há espaço para a realização de técnicas manuais das quais pude acompanhar: iodo urinário e ácido vanilmandélico (em urina) por técnicas colorimétricas; metanefrinas e normetanefrinas (em plasma e urina), peptídeo intestinal vasoativo (em plasma), 3-metoxitiramina (em plasma) e polipeptídeo pancreático (em soro) por radioimunoensaios com

utilização de um equipamento contador de radiação gama, *Wizard 1470 Gamma Counter* (Wallac); ácido 5-hidroxi-indolacético (em urina) e glucagon (em plasma) por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*); autoanticorpos anti-nucleares e autoanticorpos anti-citoplasma de granulócitos por imunofluorescência indireta.

Tabela IV – Equipamentos e respetivas análises efetuadas no Setor de Imunologia/Hormonologia SPC-IPOCFG.

Equipamento	<i>Immulite 2000 XPI</i> <b>Siemens</b>	<i>Advia Centaur XPT</i> <b>Siemens</b>	<i>Brahms Kryptor</i> <b>ThermoFisher Scientific</b>	<i>Cobas 6000 e601</i> <b>Roche Diagnostics</b>	<i>BN Prospec</i> <b>Siemens</b>	<i>Optilite Binding Site</i>
Método	Imunoensaios com deteção por					
	Quimioluminescência		Fluorescência	Eletriquimio-luminescência	Nefelometria	Turbidimetria
Parâmetros	Alfa-fetoproteína	Dehidroepian-drosterona	Antigénio associado a Carcinomas Escamosos	Ácido Fólico	Complementos 3 e 4	Cadeias leves livres Kappa e Lambda
	Androstenediona	Estradiol	Antigénio Glucídico 15.3	Anticorpos Anti-receptores da TSH	Fator Reumatóide	
	Anticorpos Anti-peroxidase	Ferritina	Cromogranina A	Anticorpos Anti-Treponémicos	Imunoglobulinas G, A e M	
	Antigénio Carcinoembrionário	Globulina Transportadora de Hormonas Sexuais	Enolase Neuro-Específica	Antigénio Glucídico 125 e 19.9	Proteína C Reativa (ultra sensível)	
	Antigénio Específico da Próstata	Hormona Estimuladora da Tiróide (TSH)	Procalcitonina	Citoqueratina CYFRA	Recetores Solúveis da Transferrina	
	Beta-2 Microglobulina	Hormona Folículo-estimulante		Cortisol	Transferrina	
	Eritropoietina	Hormona Luteínica		Dihidro-epiandrosterona,		
	Fator de Crescimento semelhante à Insulina	Oncoproteína HER-2		Insulina		
	Gastrina	Paratormona		Osteocalcitonina		
	Gonadotrofina Coriónica Humana	Pro lactina		Peptídeo associado à Gastrina		
	Hormona Adrenocorticotrófica	Progesterona		Proteína Ácida Intracelular Fixadora de Cálcio		
	Hormona do Crescimento	Testosterona		Proteína HE4		
	Imunoglobulina Estimuladora da Tiróide	Vitamina D		Tiroglobulina		
		Creatina Cinase Isoenzima MB		Triiodotironina (T3) e T3 livre		
		Mioglobina		Tiroxina (T4) e T4 livre		
		Peptídeo Natriurético tipo B		Vitamina B12		
		Troponina Cardíaca de Alta Sensibilidade				

Neste Setor, participei na rotina laboratorial, desde o registo das amostras ao seu processamento, seguindo sempre o circuito de equipamentos pré-definido. Para além disto, executei algumas das técnicas eletroforéticas e manuais.

### 2.3 – Fase Pós-Analítica

A fase final do processo analítico corresponde à validação biopatológica dos resultados que tem em conta a história clínica do doente, o histórico de resultados analíticos e o controlo de qualidade. Posto isto, é emitido um relatório final com os resultados dos parâmetros pedidos que é assinado pelo médico/técnico superior especialista.

### 2.4 – Controlo de Qualidade

Os laboratórios de análises clínicas devem assegurar que todos os resultados emitidos refletem a situação clínica dos doentes de forma fidedigna. Neste sentido, a aplicação do controlo de qualidade é de extrema importância para garantir a obtenção de resultados corretos e confiáveis, bem como, facilitar a sua organização e comunicação. Também permite evitar ou minimizar erros nos processos laboratoriais, detetando-os a tempo de serem corrigidos, sempre com foco na melhoria contínua (Santos e Junior, 2015).

Conforme referido anteriormente, uma das principais preocupações do SPC é assegurar a maior qualidade subjacente a todas as etapas do processo analítico. Para além disso, na fase analítica são efetuados dois tipos de controlo de qualidade: interno e externo. O Controlo de Qualidade Interno (CQI) é realizado diariamente nos Setores de Hematologia, Química Clínica e Imunologia/Hormonologia antes do processamento das amostras. A utilização de controlos permite avaliar a reprodutibilidade e precisão das metodologias. Estes controlos apresentam dois ou três níveis (normal, patológico alto/baixo) e são processados como amostras. Os seus resultados são analisados através de gráficos de *Levey-Jennings* consoante as regras de *Westgard*. Quando alguma destas regras é ultrapassada, é necessário averiguar o sucedido e adotar medidas para o corrigir, tais como: repetir o controlo, colocar um novo ou calibrar o equipamento. Por esta razão, este tipo de controlo implica a gestão diária de controlos, reagentes e calibradores, pela sua estabilidade. Ao contrário do Setor de Hematologia, os Setores de Química Clínica e Imunologia/Hormonologia utilizam um controlo multiparâmetros da *Bio-rad*, independente da firma comercial dos equipamentos. No Setor de Microbiologia, o CQI é realizado regularmente para o controlo estéril da solução salina e dos meios de cultura/reagentes, quando é utilizado um novo lote. Para além disso, todos os meses, o SPC participa em dois programas de Controlo de Qualidade Externo (CQE), um nacional do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) e um internacional, *Randox International Quality Assessment Scheme* (RIQAS). Estes permitem não só demonstrar qual a exatidão dos resultados como validar o sistema de qualidade implementado, através de comparações interlaboratoriais.

## Capítulo III – Microbiologia

“A infecção nosocomial não é um problema recente” (Monteiro, 1993) e está associada a uma elevadíssima taxa de mortalidade e de hospitalização em comparação com as infecções adquiridas na comunidade. A par, a resistência aos antimicrobianos e o escasso desenvolvimento de novos fármacos constituem uma grave realidade que ameaça a saúde pública a nível mundial. O consumo elevado de antimicrobianos, a utilização de dispositivos médicos, as próprias co-morbilidades, entre outras razões, fazem do ambiente hospitalar o habitat perfeito para a disseminação de estirpes resistentes (Khan, Baig e Mehboob, 2017; Sydnor e Perl, 2011). No IPOCFG esta temática tem particular importância, pois trata-se de um hospital oncológico, onde a grande maioria dos doentes se torna mais vulnerável e suscetível a infecções (Maciel e Cândido, 2010). Todos os dias chegam ao Setor de Microbiologia do SPC diversos tipos de produtos biológicos para analisar, no qual apresento toda a dinâmica de trabalho que tive oportunidade de contactar durante o estágio.

A fase pré-analítica é fundamental, uma vez que desta depende a própria qualidade da amostra a analisar. É necessária uma colheita adequada para conseguir chegar a um correto diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas. A amostra tem de ser representativa do local de infecção e para isso, a sua colheita deve respeitar normas no sentido de não a contaminar. O uso de recipientes esterilizados bem identificados e de fecho hermético bem como de material de colheita e transporte adequados e esterilizados, são alguns exemplos. Também faz parte, durante a colheita, ter que se evitar a contaminação com a microbiota do doente e, preferencialmente, este não deve estar sob terapêutica antimicrobiana (Fonseca *et al.*, 2004).

As amostras chegam ao Setor sempre identificadas e acompanhadas de uma requisição que contém a identificação do doente, a natureza do produto, os exames pedidos, a informação clínica e a identificação do médico requisitante. Nesta fase, confirmamos a identificação da amostra/requisição e fazemos uma observação do produto para averiguar se cumpre os requisitos necessários para ser analisado, como por exemplo: em termos de quantidade, aprovisionamento, procedimentos da colheita ou outros motivos que possam levar à sua rejeição. Depois de confirmar que está tudo conforme procede-se ao registo do pedido no sistema informático *Modulab*. Para além da identificação do doente com o número de dia, o sistema informático cria um número de cultura para cada exame (bacteriológico, micológico, parasitológico e/ou micobacteriológico). De forma automática, são impressas etiquetas para identificar material como meios de cultura e tubos, e uma folha de trabalho que contém toda a informação necessária para o seguimento da amostra, desde o seu

processamento até à sua validação. A rotina de trabalho começa com a análise detalhada de todas as folhas de trabalho em conjunto com as amostras correspondentes já processadas, para discussão e interpretação dos seus resultados.

### 3.1 – Processamento Laboratorial de Produtos Biológicos

Para trabalhar no laboratório de Microbiologia é fundamental seguir todas as regras de segurança de modo a minimizar o elevado risco de contaminação que este acarreta, não só para os técnicos que estão em contacto direto com os produtos biológicos, como para as próprias amostras, podendo interferir assim com a sua análise e gerar falsos resultados (Rojo-Molinero *et al.*, 2015). No Setor, todo o pessoal trabalha de acordo com as regras de segurança como: o uso obrigatório de bata e luvas, a manipulação das amostras em câmara de fluxo laminar (Figura 1) e a colocação de material contaminado (ansas, lâminas, agulhas e seringas) em contentores específicos para



Figura 1 – Câmara de fluxo laminar do Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG.

posterior tratamento. De uma forma geral, para chegar à identificação dos microrganismos patogénicos são efetuados vários passos: exame macroscópico, exame microscópico direto (a fresco ou com coloração), exame cultural, avaliação/identificação presuntiva e isolamento dos microrganismos para posteriores Testes de Identificação (ID) e de Suscetibilidade Antimicrobiana (TSA). Este processamento laboratorial varia consoante a origem da amostra e exames pedidos pelo clínico.

#### 3.1.1 – Sangue

A invasão da corrente sanguínea por microrganismos constitui uma das situações mais graves dentro de todas as doenças infecciosas, podendo levar a consequências sérias e imediatas como a falha de órgãos ou até mesmo a morte (30% a 50% das infeções sanguíneas). Sendo o sangue um fluido biológico estéril, a deteção e identificação de qualquer microrganismo é de valorizar. No entanto, devem ser tidas em conta possíveis contaminações da amostra por microrganismos da microbiota da pele. A maioria dos casos ocorre em indivíduos imunodeprimidos, estando mais associados a bacteriémia ou a fungémia por agentes patogénicos oportunistas (Tille, 2017). Posto isto, o laboratório tem um papel fulcral não só na rápida identificação deste tipo de infeções como no auxílio da escolha de fármacos direcionados.

Tanto o volume de sangue colhido como a assepsia da pele são fatores críticos neste tipo de colheita. Existe uma relação direta entre o volume de sangue (que depende dos frascos/fabricante) e a maior probabilidade de isolamento do agente etiológico da infecção. As condições de assepsia durante a colheita são determinantes para evitar a contaminação da amostra, principalmente com a microbiota da pele do doente. O facto de se colher sangue de duas veias periféricas diferentes para dois frascos diferentes ajuda a descartar possíveis contaminações aquando a discussão de resultados (Fonseca *et al.*, 2004; Tille, 2017).

No IPOCFG, a colheita de sangue para hemocultura é efetuada por punção venosa de, pelo menos, duas veias periféricas diferentes e de cateter venoso central (quando presente) diretamente para os frascos de hemocultura (Figura 2).



Figura 2 – Frascos de hemocultura BD Bactec e respetivo equipamento.

Legenda: A-Hemocultura para Aeróbios; B-Hemocultura para Anaeróbios; C-Hemocultura para Micobactérias; D-Bactec 9050 Blood Culture System da BD. (Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG)

Consoante o pedido do clínico e a suspeita dos agentes patogénicos causadores da infeção, as amostras são colhidas para os frascos apropriados. Os mais requisitados são os de hemocultura para aeróbios (Figura 2-A) que permitem o crescimento da maioria das bactérias e fungos leveduriformes. Estes contêm um meio líquido de tripticase de soja associado a anticoagulante polianetolsulfonato e resinas quelantes, muito vantajosos para inibir a atividade antimicrobiana farmacológica, que tem como consequência o crescimento atenuado dos microrganismos, evitando assim falsos negativos (Fonseca *et al.*, 2004). Os frascos de hemocultura para anaeróbios (Figura 2-B) contêm meio líquido de tripticase de soja reduzido com dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e azoto com adição de agentes hemolisantes, o que permite isolamento de microrganismos anaeróbios, fastidiosos e intracelulares. Nestes dois tipos de frasco, o volume indicado de sangue colhido deve ser entre 8 e 10 mL. Apesar de raramente pedido, é possível o isolamento de micobactérias utilizando frascos que possuem meio líquido de *Middlebrook 7H9* e de Infusão Cérebro Coração, com volume de sangue compreendido entre 1 e 5 mL (Figura 2-C).

Após a recepção dos frascos, são colocados no equipamento *Bactec 9050 Blood Culture System* (Figura 2-D). Este possui um sistema automatizado que permite, de forma simultânea, monitorizar, agitar e incubar as hemoculturas a 35°C de temperatura. A sua metodologia baseia-se na deteção por fluorescência de CO<sub>2</sub> resultante do metabolismo dos microrganismos, a partir de um sensor químico que se encontra no fundo de cada frasco e é permeável ao gás. Este sensor é monitorizado pelo equipamento a cada 10 minutos relativamente ao aumento da fluorescência, proporcional à quantidade de CO<sub>2</sub>. O sistema fornece alarmes visuais e sonoros no momento em que uma amostra se torna positiva, indicando assim a presença presumida de microrganismos num determinado frasco (Mahon e Lehman, 2019).

### Hemoculturas Positivas

As hemoculturas positivas são retiradas do equipamento para se proceder ao seu processamento. Com recurso a uma seringa retira-se uma quantidade suficiente de sangue para repicar nos seguintes meios de cultura sólidos: gelose *Columbia* suplementada com 5% de sangue de carneiro (COS) para aeróbios ou COS e gelose *Schaedler* com 5% de sangue de carneiro reduzida (SCS) para anaeróbios. COS é um meio não seletivo que permite o crescimento da maioria das bactérias e leveduras, e ainda verificar se há presença de hemólise bem como classificá-la (Figura 3). O SCS é um meio de isolamento específico para pesquisa de bactérias anaeróbias e facultativas que é incubado em anaerobiose por colocação numa bolsa plástica transparente com um gerador de atmosfera anaeróbia *GENbag* e um indicador que garante o controlo da mesma (Fonseca *et al.*, 2004).



Figura 3 – Presença de  $\beta$ -Hemólise em COS por *Staphylococcus aureus*. (Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG)

Os meios são estriados com uma ansa de plástico esterilizada, pela técnica de esgotamento do produto à superfície de meio sólido, e colocados na estufa a incubar durante 24-48 horas (aeróbios) ou 5 dias (anaeróbios) a 37°C. Em paralelo à repicagem para meios sólidos, retira-se uma gota de sangue para duas lâminas e espalha-se de forma suave. Deixa-se secar, obtendo assim dois esfregaços sanguíneos. Um dos esfregaços sanguíneos procede para coloração pela técnica de *Gram*. O duplicado serve de prevenção, no caso de acontecer algum acidente com o primeiro esfregaço ou em caso de dúvida, para sua confirmação.

Primeiro a lâmina é fixada por ação do calor e, de seguida, é efetuada a coloração conforme descrito na Tabela V.



Tabela V – Procedimento para coloração de Gram utilizado no Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG.

	Reagentes	Tempo
1º	<b>1º Corante</b> Violeta de Genciana	1 minuto
2º	<b>Mordente</b> Soluto de Lugol	30 segundos
3º	<b>Diferenciador</b> Álcool-Acetona	Gota-a-gota até descorar
4º	Lavagem em água corrente	
5º	<b>2º Corante</b> Fucsina diluída	30 segundos
6º	Lavagem e secagem	

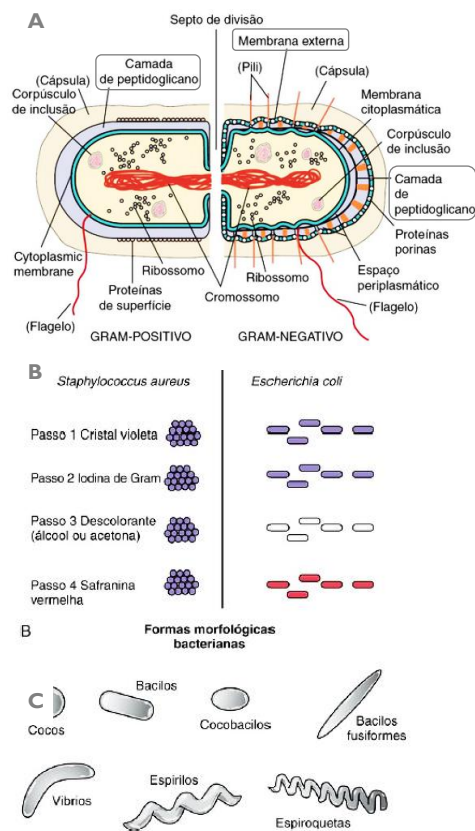


Figura 4 – Morfologia bacteriana e coloração de Gram. Legenda: A-Diferença estrutural entre bactérias Gram-positivo e Gram-negativo; B-Coloração de Gram; C-Morfologia bacteriana. [Adaptado do livro Microbiologia Médica, 7ªed., Elsevier (2014)]

Consoante os componentes químicos e estruturais da parede celular, a maioria das espécies bacterianas dividem-se em dois grandes grupos (Figura 4-A e B): as Gram-positivo (cor violeta) que possuem uma parede com camada espessa de peptidoglicano e por isso, absorvem o corante violeta de genciana, não descolorando na aplicação do diferenciador; e as Gram-negativo (cor rosa) que descoram o 1º corante e integram a fucsina diluída por apresentarem uma membrana externa e uma fina camada de peptidoglicano. A coloração de Gram fornece assim uma rápida identificação presuntiva, permitindo verificar a morfologia e agrupamento (Figura 4-C). Nesta técnica, a maior parte das bactérias podem ser detetadas, exceto as que não possuem parede celular ou que não são coradas pela mesma, como é o caso dos bacilos ácido-álcool resistentes. As leveduras também podem ser coradas, apresentando a cor violeta por adquirirem o 1º corante (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2014; Tille, 2017).

Os esfregaços são depois visualizados ao microscópio ótico na objetiva de 50x ou 100x com imersão em óleo, sendo anotado na folha de trabalho a forma e tipo de Gram das bactérias, bem como outras observações clinicamente relevantes.

Passado cerca de 24 horas, retiram-se os meios de cultura da estufa para observação macroscópica das colónias. Esta observação consiste na identificação presuntiva dos microrganismos pelas características da

colónia quanto à sua forma, dimensão, elevação, bordo, superfície, consistência e tipo de hemólise (Fonseca et al., 2004). Consoante estas características e as observadas no exame microscópico, conseguimos direcionar a amostra para a escolha da carta de identificação a utilizar no equipamento Vitek 2 Compact 15 (BioMérieux), cujo procedimento é explicado no ponto 3.2 – Identificação Microbiana e Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana.

### Hemoculturas Negativas

Caso não haja crescimento presumido de microrganismos, as hemoculturas mantêm-se a incubar no *Bactec 9050 Blood Culture System* durante determinado tempo até serem consideradas negativas: 7 dias para pesquisa bacteriológica (aeróbios e anaeróbios) e 14 dias para pesquisa de fungos. Para aferir que a amostra é mesmo negativa e poder excluir falsos negativos, procede-se a esfregaço sanguíneo com coloração de *Gram*. O exame microscópico deve comprovar a ausência de microrganismos.

### **3.1.2 – Secreções Respiratórias**

Os doentes oncológicos apresentam elevada probabilidade de contrair infecções, sendo as infecções do aparelho respiratório inferior uma das manifestações clínicas mais frequente (Tille, 2017). No Setor de Microbiologia do IPOCFG, as amostras respiratórias mais comuns são expetorações, lavados, aspirados brônquicos e, as menos comuns, o escovado brônquico e líquido pleural. O processamento laboratorial deste tipo de amostras começa com a avaliação macroscópica do produto recebido. De preferência, seleciona-se uma porção purulenta para realização de esfregaço, seguida de coloração de *Gram* e exame direto ao microscópio. No caso do líquido pleural, e outras amostras mais fluídas, centrifuga-se no sentido de concentrar os microrganismos que estejam presentes.

Nas amostras de expetoração, o exame direto permite avaliar a sua qualidade, pela quantidade de células epiteliais pavimentosas da orofaringe e de leucócitos segundo os critérios de *Murray-Washington* (Tabela VI). Segundo estes critérios, as amostras a serem processadas apresentam-se nos grupos 4 e 5. Assim, conseguem-se descartar possíveis contaminações pela microbiota da orofaringe. Contudo, existem exceções em que estes critérios não podem ser aplicados, como é o caso de doentes neutropénicos (Fonseca *et al.*, 2004). Esta condição deve ser tida em conta, uma vez que se tratam de amostras provenientes de doentes oncológicos.

Tabela VI – Critérios de *Murray-Washington*.

Grupo	Células Epiteliais 10x	Leucócitos 10x
1	25	10
2	25	10-25
3	25	25
4	10-25	25
5	<10	25

Observa-se o esfregaço ao microscópio ótico em pequena ampliação e quantifica-se, em média por campo, o número de células epiteliais e de leucócitos. Os grupos 4 e 5 (Figura 5) correspondem a verdadeiras expetorações, podendo ser analisadas como tal. Os grupos de 1 a 3 demonstram que a amostra está contaminada, sendo esta informação analisada com o caso clínico aquando a discussão dos resultados. Depois da realização do esfregaço, é efetuado exame cultural consoante os exames pedidos.

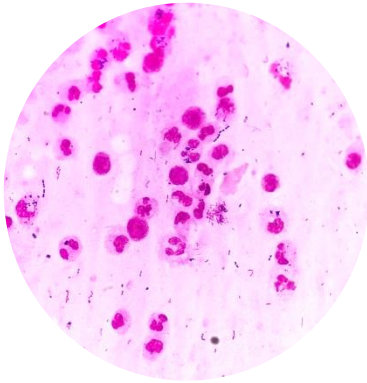


Figura 5 – Coloração de Gram (x50) de uma expetoração representativa do grupo 5 dos critérios de Murray-Washington. (Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG)



Figura 6 – *Neisseria meningitidis* isolada em PVX. (Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG)

### Exame Bacteriológico

Uma pequena porção das amostras respiratórias pode ser previamente inoculada, se necessário, em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), um meio de enriquecimento não seletivo que permite o crescimento da maioria das bactérias aeróbias ou facultativas e fungos (Fonseca *et al.*, 2004). Depois são semeadas em placas de COS e gelose Chocolate com *PolyViteX* (PVX), e incubadas em estufa com atmosfera CO<sub>2</sub> a 37°C durante 24 horas. O meio PVX é um meio enriquecido, não seletivo, que se destina ao isolamento de bactérias fastidiosas como *Neisseria* spp. (Figura 6) e *Haemophilus* spp. que não se desenvolvem em COS. É obtido a partir da gelose *Columbia* com mistura de sangue que é sujeita a uma temperatura de 80°C, favorecendo a hemólise dos eritrócitos (Fonseca *et al.*, 2004). Assim são libertados os fatores X (Hemina) e V (Nicotinamida Adenina Dinucleótido) que enriquecem este meio juntamente com o *PolyViteX*, permitindo o crescimento das bactérias dos géneros referidos em cima.

Passadas 24 horas, os meios são analisados e, para isso, como para todos os produtos biológicos, o conhecimento da microbiota de onde é proveniente a amostra é fundamental para a avaliação e discussão dos resultados. A existência de uma colónia com características diferentes das da microbiota ou o predomínio evidente de um tipo de colónia, confirmado com o observado no *Gram*, revela a possibilidade de se tratar do microrganismo responsável pela infeção. Neste sentido, procede-se à identificação com realização de TSA. Pelo contrário, se existirem na mesma proporção três ou mais colónias distintas, a amostra é considerada polimicrobiana.

### Exame Micológico

Em paralelo com o exame cultural para bactérias, a amostra é também semeada pela técnica de esgotamento do produto à superfície do meio sólido em duas placas de gelose *Sabouraud* com Gentamicina e Cloranfenicol (SGC). Este é um meio seletivo que favorece o crescimento dos fungos (leveduriformes e filamentosos) por ser um meio rico em peptonas e em dextrose com adição dos dois antibióticos que inibem o crescimento tanto de bactérias *Gram*-positivo como *Gram*-negativo. As placas são seladas com parafilme no sentido de evitar

não só a sua desidratação como contaminação. De seguida são incubadas em aerobiose mas em estufas com temperaturas diferentes, uma placa a 37°C e outra a 30°C. A placa de SGC incubada a 37°C é analisada quanto ao crescimento de leveduras, que é valorizado na ausência de crescimento bacteriano. No entanto, qualquer amostra positiva para crescimento de fungos leveduriformes é guardada na estufa de 30°C juntamente com a outra placa SGC, até completar 1 mês. Ao fim desse tempo, as leveduras são repicadas para COS e identificadas no equipamento *Vitek 2 Compact 15* para estudo epidemiológico da microbiota fúngica dos doentes do IPOCFG.

O crescimento dos fungos filamentosos, nas duas placas, é avaliado durante 30 dias, pois o seu desenvolvimento é mais fastidioso que o das leveduras. Se existir crescimento de fungos filamentosos começa-se por observar, em termos macroscópicos, a cor, o tipo de micélio e o aspeto/textura da colónia. Para efetuar o exame microscópico, coloca-se uma gota de azul de lactofenol em duas lâminas e, pelo método da fita-cola, os pedaços de fita-cola que contactaram com a colónia são depositados sobre as mesmas. Este exame consiste na observação das hifas, se são septadas/aseptadas com ou sem

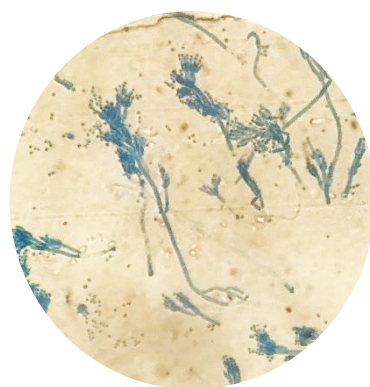


Figura 7 – Observação microscópica (x40) de *Penicillium* spp. – fungo filamentoso cosmopolita. (Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG)

pigmentação e na identificação das estruturas reprodutoras (Figura 7)(Mahon e Lehman, 2019). Para além disso, é efetuada repicagem do fungo com auxílio de um estilete esterilizado, em que um pedaço de gelose com fungo na periferia da colónia é cortado e colocado no centro de um novo meio SGC. Esta repicagem permite o crescimento contínuo do fungo e, se necessário, a continuação do seu estudo. A existência de fungos filamentosos com as mesmas características nos dois meios SGC é de valorizar. Pelo contrário, se só existir crescimento num dos meios ou se houver mais do que um tipo de fungo, é provável que tenha ocorrido contaminação da amostra. Neste caso, pode ser pedida nova colheita.

### Exame Micobacteriológico

Este exame é requisitado para pesquisa de micobactérias quando há suspeitas de infeção por estes microrganismos, nomeadamente por *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico da Tuberculose. Quando o produto respiratório é recebido preparam-se dois esfregaços para coloração de *Kinyoun* cujo procedimento está descrito na Tabela VII. Este tipo de coloração diferencial consiste na modificação do método clássico de *Ziehl-Neelsen*, sendo mais seguro por ser uma “técnica a frio”. Esta permite a pesquisa de bacilos ácido-álcool

Tabela VII – Procedimento para coloração de *Kinyoun* utilizado no Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG.

	Reagentes	Tempo
1º	1º Corante Carbolfucsina	4 minutos
2º	Lavagem em água corrente	
3º	Descorante	5 segundos
4º	Lavagem em água corrente	
5º	2º Corante Verde-Brilhante	30 segundos
6º	Lavagem e secagem	

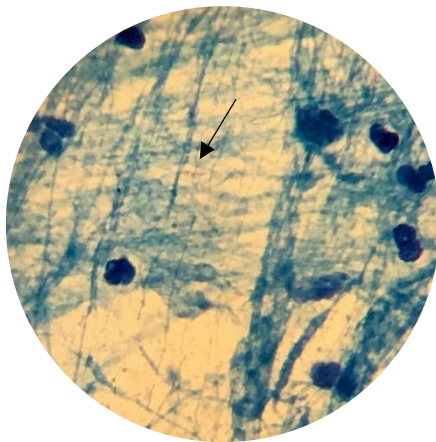


Figura 8 – Coloração de *Kinyoun* (x50) com presença de BAAR corados a vermelho. (Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG)

Tabela VIII – Interpretação dos esfregaços para pesquisa de BAAR por coloração de *Kinyoun* utilizada no Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG.

Número de BAAR observados	Interpretação
0	Negativo
1 a 2 /300 campos	Duvidoso (confirmar)
1 a 9 /100 campos	Positivo
1 a 9 /10 campos	
1 a 9 /campo	
> 9 /campo	

resistentes (BAAR) cuja parede celular é constituída por ácidos micólicos, tornando-os resistentes ao processo de descoloração pela técnica de *Gram* (Tille, 2017). Assim, as micobactérias adquirem cor vermelha por incorporação da carbolfucsina e outros microrganismos ou células presentes coram de azul, graças ao corante de contraste verde-brilhante conforme demonstrado na Figura 8. A quantidade de BAAR observados no esfregaço é interpretada de acordo com a Tabela VIII.

De seguida, é necessário proceder à homogeneização com o intuito de descontaminar e fluidificar a amostra, bem como concentrar todas as micobactérias que possam existir. Da amostra já homogeneizada, efetuam-se dois novos esfregaços para coloração de *Kinyoun* e observação ao microscópio. De seguida, semeia-se em tubo com meio de *Löwenstein Jensen* (LJ), gelose COS e inocula-se num Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias (MGIT). O meio LJ é enriquecido com ovo, fécula de batata e asparagina, o que favorece o desenvolvimento destas bactérias caracteristicamente fastidiosas e de crescimento lento (Costa, Silva e Gonçalves, 2018). Este meio é incubado a 37°C em aerobiose, com inclinação do tubo a 45° e tampa semi-apertada virada para cima durante 8 semanas. O MGIT destina-se à deteção de crescimento de micobactérias através de um composto fluorescente que é sensível à presença de oxigénio no tubo (Ardito *et al.*, 2001). Os tubos são monitorizados durante o período de 42 dias, num equipamento próprio para leitura de fluorescência que, consoante um valor de *cut-off*, a amostra

é negativa ou positiva. A gelose COS serve de controlo para averiguar se a homogeneização foi eficaz, pois caso exista crescimento de colónias nesta gelose significa que temos de repetir de novo este processo. Os tubos LJ e MGIT são observados todas as semanas em simultâneo, no sentido de visualizar se há ou não desenvolvimento de micobactérias.

A observação macroscópica em LJ de colónias de aspeto áspero com textura proeminente e padronizada (tipo “couve-flor”) são típicas de *M. tuberculosis* (Figura 9)(Mahon e Lehman, 2019). No Setor de Microbiologia, sempre que se verifique crescimento de colónias em meio LJ executa-se esfregaço com coloração de *Kinyoun* para visualização microscópica, independentemente de qual for o aspeto das colónias. Se existirem BAAR no esfregaço procede-se para pesquisa de *M. tuberculosis* por PCR em tempo real no equipamento *GeneXpert*. Se houver deteção, a amostra é enviada para o Laboratório de Microbiologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) para fazer TSA. Caso contrário, se observados BAAR ao microscópio e não foram detetados por PCR, podemos estar perante outra espécie de micobactéria e, por este motivo, a amostra é enviada para o CHUC para ID e TSA.



Figura 9 – Colónias de micobactérias em meio LJ. (Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG)

### 3.1.3 – Exsudatos Purulentos Superficiais e Profundos

Várias situações clínicas por infeções localizadas conduzem à formação de exsudatos purulentos por determinados microrganismos. Para o seu estudo é necessário ter em consideração o local da infeção (lesão aberta/fechada), informação clínica, tipo de infeção com ou sem abscesso e o procedimento de colheita, seja por aspiração em seringa, por zaragatoa ou biópsia (Fonseca *et al.*, 2004). Consoante o pedido do clínico são realizados os seguintes exames, sendo que também pode ser realizado o exame micobacteriológico em amostras de biópsia com procedimento semelhante ao anteriormente explicado. Por rotina, as amostras colhidas em zaragatoa são analisadas por exame bacteriológico e micológico, enquanto que as amostras colhidas em seringa e que contenham tampa fechada, é também realizada a pesquisa de bactérias anaeróbias.

#### Exame Bacteriológico e Micológico

As amostras são semeadas nos meios COS, PVX e SGC que são incubados a 37°C durante 18-24 horas. No caso de ser uma amostra proveniente de uma lesão profunda/fechada, semeia-se a amostra em SCS e coloca-se em atmosfera de anaerobiose (*GENbag*) a 37°C durante 5 dias para pesquisa de anaeróbios. Se necessário, inocula-se a amostra em BHI e/ou caldo de *Schaedler* com vitamina k3 (KCS). KCS é um meio reduzido destinado a enriquecer bactérias anaeróbias e utilizado para amostras em que pode ser provável a infeção por estes microrganismos. Nestes meios é importante que a tampa do BHI fique semi-apertada para haver entrada de oxigénio e a do KCS fique bem fechada para manter





Figura 10 – Crescimento microbiano nos meios líquidos KCS e BHI. Legenda: A-Turvo (com crescimento); B-Sem turvação (sem crescimento). (Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG)

a anaerobiose. Estes são incubados a 37°C durante o tempo necessário, pois trata-se de meios de enriquecimento. A turvação do meio após incubação indica crescimento microbiano (Figura 10). Também se preparam duas lâminas para coloração de Gram. No exame direto, para além da morfologia bacteriana, é necessário anotar a quantidade e tipo de leucócitos (polimorfonucleares/mononucleares) observados. A predominância de leucócitos polimorfonucleares aponta para infeções de origem bacteriana, enquanto que a presença de leucócitos mononucleares pressupõe infeção viral. Passadas 24 horas, o crescimento em placas e BHI é observado e valorizado com os resultados do Gram. No caso dos anaeróbios, em primeiro observa-se se há crescimento no meio líquido KCS pela sua turvação, e em segundo, nas placas SCS que estão em anaerobiose. Se existir crescimento nos caldos, em ambos é realizado esfregaço para coloração de Gram e efetuada sementeira em placa. A partir do BHI semeia-se para placa de COS e do KCS semeia-se para COS (aerobiose) e SCS (anaerobiose). As placas COS incubam durante 18-24 horas e as SCS durante 5 dias.

Feita a identificação presuntiva, procede-se para ID e TSA das colónias suspeitas. A amostra é negativa se se observar um crescimento proporcional de diversas colónias com aspeto característico da microbiota local de onde a amostra é proveniente ou se, pelo contrário, não houver crescimento de qualquer microrganismo.

### 3.1.4 – Fezes

Os microrganismos que colonizam o trato gastrointestinal desempenham um papel significativo na proteção do hospedeiro contra diversas infeções. Em indivíduos com cancro, tanto a quimioterapia como a imunoterapia induzem mudanças drásticas na composição da microbiota intestinal. Assim, para além de terem o sistema imunológico comprometido, estes indivíduos apresentam um aumento do risco de adquirirem infeções gastrointestinais (Aarnoutse *et al.*, 2019; Mahon e Lehman, 2019).

No Setor de Microbiologia, por rotina faz-se pesquisa de *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Campylobacter* spp., no entanto, a pedido do clínico podem ser pesquisados outros agentes infecciosos com recurso a outros exames e testes imunocromatográficos. O processamento começa pela observação macroscópica das fezes no sentido de observar a sua consistência, odor e presença de sangue, mucos e/ou vermes parasitas adultos (Fonseca *et al.*, 2004).

Exame Bacteriológico para pesquisa de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp.

Ambos os géneros *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. pertencem à família *Enterobacteriaceae* e são patogêneos intestinais para o Homem, uma vez que não fazem parte da microbiota intestinal normal. A sua transmissão ocorre de pessoa para pessoa por via fecal-oral através de comida ou água contaminada, principalmente em áreas com pobres condições sanitárias. Todos os serotipos de *Salmonella* spp. são bacilos *Gram*-negativo, anaeróbios facultativos, móveis e alguns com produção de gás Sulfureto de Hidrogénio (H<sub>2</sub>S). *Shigella* spp. caracteriza-se por ser bacilo *Gram*-negativo, aeróbio facultativo, não móvel e não produz H<sub>2</sub>S. Os dois géneros são beta-galactosidase negativa e, portanto, não fermentam a lactose (Tille, 2017).

Uma pequena porção da amostra fecal é semeada pela técnica de esgotamento do produto à superfície do meio sólido em *Hektoen* (HEK) e Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD). Estes meios são seletivos e diferenciais, pois permitem tanto o isolamento como a distinção destas bactérias em relação a outras. A gelose HEK contém na sua composição uma concentração de sais biliares que inibe o crescimento de bactérias *Gram*-positivo e da maioria das *Gram*-negativo que fazem parte da microbiota intestinal normal. A lactose, salicina e sacarose também são parte integrante da composição deste meio e permitem a determinação da fermentação bacteriana que é revelada pela alteração de pH. O meio é constituído por azul de bromotimol e fucsina ácida, que em meio ácido alteram a cor do meio para laranja. Para além destes, o tiosulfato de sódio e o citrato férrico amoniacal permitem a deteção da produção de H<sub>2</sub>S pela tiosulfato redutase, quando presente. O tiosulfato de sódio serve de substrato à enzima e o citrato férrico amoniacal atua como revelador do produto da reação enzimática, uma vez que H<sub>2</sub>S é incolor. Os iões férricos, em meio ácido, combinam-se com o H<sub>2</sub>S e formam sulfureto ferroso, um precipitado negro visível. A maioria das bactérias não-patogénicas fermenta ambos os açúcares, o que leva à acidificação do meio e à apresentação da cor laranja/salmão das suas colónias. As bactérias não fermentadoras, como *Salmonella* spp. e *Shigella* spp., originam colónias verdes/incolores, sendo que colónias de *Salmonella* spp. podem apresentar um precipitado negro devido à produção de H<sub>2</sub>S. A gelose XLD, como o próprio nome indica, contém desoxicolato de sódio que inibe o crescimento de alguns bacilos *Gram*-negativo da microbiota intestinal e todas as bactérias *Gram*-positivo. A concentração de sais biliares é mais baixa do que no meio HEK tornando-o menos seletivo mas, no entanto, a recuperação de *Shigella* spp. é mais eficaz. A sacarose, lactose e xilose possibilitam a identificação da fermentação a partir da alteração de pH indicado pelo vermelho de fenol. A lisina permite a deteção da sua descarboxilação por ação da lisina descarboxilase. Para além destes constituintes, este meio também apresenta tiosulfato de sódio e citrato férrico



amoniacal que, conforme explicado em cima, são necessários na detecção de bactérias produtoras de H<sub>2</sub>S. Posto isto, colónias amarelas são constituídas por bactérias fermentadoras que acidificam o meio e alteram a cor do indicador de pH para amarelo. Colónias incolores ou vermelhas (cor do meio) são características de *Shigella* spp. e *Salmonella* spp. sendo que as desta última podem apresentar centros negros (Mahon e Lehman, 2019). Ambas as placas são incubadas na estufa em aerobiose, a 37°C durante 18-24 horas. Uma pequena parte da amostra também é inoculada em caldo de Selenito e caldo *Gram-Negative* (GN) para enriquecimento de *Shigella* spp. e *Salmonella* spp.. No meio de Selenito, o selenito de sódio inibe a maioria das *Enterobacteriaceae* permitindo assim a recuperação do baixo número de bactérias de *Salmonella* spp. e de apenas algumas espécies de *Shigella*. O caldo GN é um meio seletivo que contém sais de citrato e desoxicolato que vão inibir o crescimento de bactérias *Gram*-positivo e algumas *Gram*-negativo pertencentes à microbiota intestinal. O enriquecimento neste meio é fornecido pelo aumento da concentração de manitol que favorece temporariamente (entre 6 a 12 horas) o crescimento de bacilos *Gram*-negativo fermentadores de manitol, como *Shigella* spp. e *Salmonella* spp., em relação aos não fermentadores de manitol, como *Proteus* spp.. Ambos os tubos são incubados a 37°C com tampa semi-apertada, em aerobiose durante 6-12 horas, uma vez que o efeito inibitório diminui após esse tempo (Fonseca *et al.*, 2004; Mahon e Lehman, 2019). A turvação dos meios líquidos indica a existência de crescimento bacteriano, pelo que é efetuada repicagem para meios sólidos HEK e XLD com posterior incubação.

Os meios com colónias amarelas em XLD ou alaranjadas em HEK são considerados negativos para presença de *Shigella* spp. e *Salmonella* spp. (Figura 11-A e B). Pelo contrário, a presença de colónias incolores, vermelhas em XLD ou verdes em HEK (Figura 11-C) com ou sem presença de centro negro são de valorizar, pelo que se procede para o seu isolamento, identificação e TSA.



Figura 11 – Meios de cultura XLD e HEK. Legenda: A-Colónias amarelas beta-galactosidase-positivas isoladas em XLD; B-Colónias laranja beta-galactosidase-positivas isoladas em HEK; C-Colónias incolores/verdes beta-galactosidase-negativas isoladas em HEK. (Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG)

### Testes Imunocromatográficos para pesquisa de *Campylobacter* spp. e *Clostridium difficile*

Após realização do exame bacteriológico, é realizado o teste imunocromatográfico de detecção rápida e qualitativa de antígenos de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*. No caso de o clínico suspeitar de infecção por *Clostridium difficile* e de as fezes do doente serem diarreicas, faz-se pesquisa da enzima glutamato desidrogenase desta bactéria por teste imunocromatográfico. A positividade em ambos os testes, é sempre confirmada, por cultura em gelose *Campylosel* que é seletiva para *Campylobacter* spp. e por detecção das toxinas de *Clostridium difficile* por métodos de biologia molecular, respetivamente.

### Exame Micológico

O crescimento das leveduras só é valorizado na ausência de crescimento bacteriano (Figura 12), uma vez que são parte constituinte da microbiota intestinal. Portanto, as placas que apresentam crescimento isolado de leveduras são repicadas para placas SGC pela técnica de esgotamento do produto à superfície do meio sólido e incubadas em aerobiose a 37°C durante 18-24 horas. Realizada a incubação, procede-se para ID e TSA das leveduras.



Figura 12 – Crescimento isolado de leveduras em HEK. (Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG)

### Exame Parasitológico

Para exame direto a fresco, prepara-se em primeiro lugar um esfregaço fino em que se coloca uma porção da amostra numa lâmina e consoante a sua consistência poderá haver a necessidade da sua diluição em soro fisiológico. Coloca-se uma gota de soluto de lugol e uma lamela, e o esfregaço é observado ao microscópio ótico. Começa-se por observar as estruturas parasitárias maiores na objetiva de x10, como é o caso dos ovos e larvas. Depois as estruturas de menor dimensão, como quistos, na de x40. Em segundo lugar, é efetuada concentração pelo método de *Ritchie* com o intuito de concentrar estruturas parasitárias (ovos, quistos e larvas) que possam estar presentes na amostra. A partir de sucessivas centrifugações e de adição de formol 10% e éter ocorre a formação de um sedimento. Este método permite a separação dos ovos e quistos dos parasitas em resíduos fecais, permitindo assim a sua melhor detecção que é mais dificultada no exame direto a fresco (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2014). A partir deste sedimento é efetuado novo esfregaço e observado ao microscópio para pesquisa e identificação dessas estruturas. Em paralelo, é realizado um teste imunocromatográfico para detecção rápida e qualitativa de antígenos de *Giardia lamblia* e/ou *Cryptosporidium parvum*.

### 3.1.5 – Urina

As Infecções do Trato Urinário (ITU) são das infecções mais frequentes, sendo geralmente causadas por bactérias da microbiota intestinal que invadem o aparelho urinário por via da uretra, como é o caso das *Enterobacteriaceae*, com principal destaque da *Escherichia coli* uropatogénica (Fonseca *et al.*, 2004). O ambiente hospitalar desempenha um papel importante na determinação dos microrganismos envolvidos neste tipo de infeções, uma vez que há maior probabilidade de os doentes internados estarem infetados por vários microrganismos com variadas resistências aos antimicrobianos. Também muitos destes doentes apresentam fatores de risco como algália permanente, tubos de nefrostomia, cálculos urinários e outras patologias associadas ao aparelho urinário. Nestes casos, os agentes etiológicos alargam-se a *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Enterococcus spp.* e fungos. As ITU representam aproximadamente 35% de todas as infeções associadas aos cuidados de saúde e, para além disso, são a fonte mais comum de bacteriémia (Fonseca *et al.*, 2004; Tille, 2017).

No Setor são recebidas amostras de urina em contentor estéril colhidas a partir de jato médio, de punção supra-púbica, de punção de cateter urinário ou de drenagem de nefrostomia/ureterostomia, sendo que as mais comuns são as urinas de jato médio. Dentro de todas as amostras recebidas, as de urina são das mais prevalentes na rotina laboratorial. Para evitar a contaminação da amostra, o seu processamento começa pela realização da urocultura e só depois é que se procede à sumária de urina.

#### Urocultura

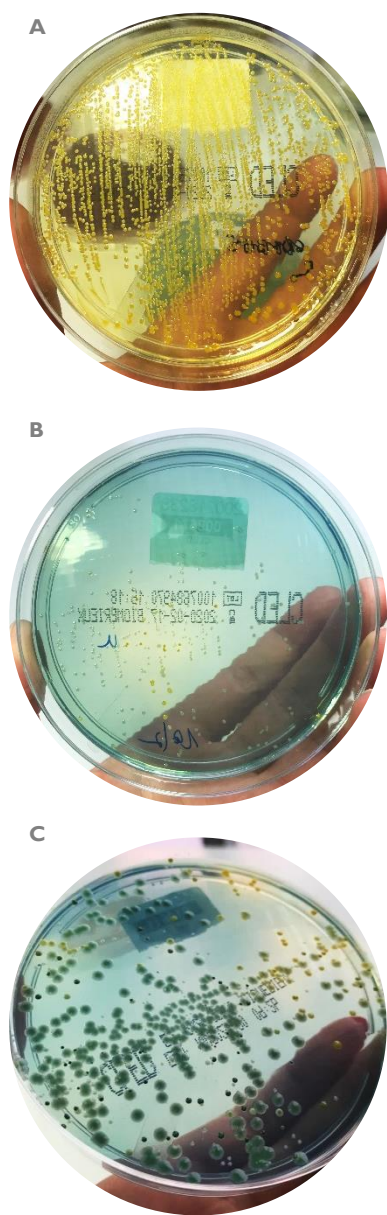
A urocultura consiste na quantificação e identificação dos microrganismos responsáveis pela infeção urinária. Com uma ansa de plástico calibrada a 10 µL procede-se à homogeneização da urina e sementeira pela técnica quantitativa de um só plano nos seguintes meios sólidos: gelose Cistina-Lactose-Deficiente em Eletrólitos (CLED) e gelose *Columbia* com Colistina e Ácido Nalidíxico com 5% de Sangue de Carneiro (CNA). CLED é um meio não seletivo mas diferencial, utilizado no isolamento e quantificação de colónias de agentes patogénicos ou contaminantes urinários. A deficiência em eletrólitos inibe a proliferação indevida de *Proteus spp.*, enquanto que a lactose permite diferenciar os microrganismos fermentadores dos não-fermentadores. Esta diferenciação é visível graças ao indicador de pH azul de bromotimol, em que bactérias fermentadoras da lactose acidificam o meio e este fica amarelo (por exemplo: *Escherichia coli*). Pelo contrário, as bactérias não-fermentadoras não alteram a cor, permanecendo azul (por exemplo: *Pseudomonas aeruginosa*). A gelose CNA é

um meio seletivo para bactérias *Gram*-positivo, uma vez que a colistina e o ácido nalidíxico inibem o crescimento de determinadas bactérias *Gram*-negativo, como *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonaceae* (Fonseca *et al.*, 2004). No caso de existir pedido para exame micológico ou após incubação existir crescimento de fungos, a urina é semeada em SGC. Os meios são incubados a 37°C, em aerobiose durante 18-24 horas.

### Sumária de Urina

A sumária de urina consiste na avaliação de determinados parâmetros físicos e bioquímicos e na observação do sedimento urinário. A nível macroscópico, a urina é observada quanto à sua cor e aspeto. De seguida, são utilizadas tiras-teste *Combur10 Test M* que

apresentam 10 zonas distintas impregnadas com diferentes reagentes e que permitem a determinação semi-quantitativa de parâmetros tais como: densidade relativa, pH, leucócitos, nitritos, proteínas, glucose, corpos cetónicos, urobilinogénio, bilirrubina e sangue. As tiras-teste são mergulhadas num tubo com cerca de 10 mL de urina não centrifugada durante 1 segundo e são rapidamente colocadas no equipamento *Cobas u411* para efetuar a sua leitura. Esta é baseada na alteração da cor pré-definida para os vários parâmetros decorrente das reações químicas ocorridas. Posto isto, a urina é centrifugada a 1500 rpm durante 5 minutos para obter o sedimento urinário. Com uma pipeta, aspira-se uma parte do sedimento e coloca-se uma gota em lâmina com lamela para visualização ao microscópio. Este exame permite a observação de elementos celulares (eritrócitos, leucócitos e células epiteliais), cristais e/ou cilindros. Para todos os elementos anota-se a sua quantidade/abundância bem como a sua classificação.



A valorização dos resultados tem em conta o método de colheita de urina e a história clínica do doente que inclui a idade, sexo, sintomatologia, resultados bacteriológicos anteriores e terapêutica antibiótica (Tille, 2017). Nas uroculturas, a urina de jato médio é considerada positiva quando existem  $10^5$  ou mais Unidades Formadoras de Colónias (UFC) por mililitro no meio CLED, que equivale a uma contagem igual ou superior a 1000 colónias (Figura 13-A).

Figura 13 – Uroculturas em meio CLED. Legenda: A-Urocultura positiva; B-Urocultura negativa; C-Urocultura polimicrobiana. (Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG)

Amostras com contagem inferior são consideradas negativas (Figura 13-B). Contudo, consoante a situação clínica pode ser valorizada a contagem de  $10^4$  entre  $10^5$  UFC/mL, equivalente a 100-1000 colónias. As amostras de urina provenientes de punção supra-púbica ou de cateter urinário que apresentem crescimento são positivas independentemente da sua quantificação e no caso de não apresentarem características presuntivas de bactérias comensais da pele, descartando assim a sua possível contaminação. Na interpretação das uroculturas são valorizadas amostras que apresentem crescimento até, no máximo, de três colónias distintas. Consoante as suas características macroscópicas é realizada a identificação presuntiva no sentido de proceder à sua identificação definitiva e TSA. As amostras com mais de três tipos de colónias distintas são consideradas polimicrobianas (Figura 13-C) e, consoante decisão clínica, pode ser repetida nova colheita da amostra. Conforme é efetuada a avaliação das uroculturas, são também analisados os resultados das sumárias de urina que fornecem informações importantes para a sua interpretação. Por exemplo, a presença ou abundância de elementos como leucócitos, nitritos e eritrócitos é sugestiva de estarmos perante uma ITU. A presença de células epiteliais ajuda a esclarecer sobre a qualidade da amostra em termos de contaminações.

### 3.1.6 – Ponta de Cateter

Os cateteres intravasculares são parte integrante dos cuidados de muitos doentes hospitalizados. A principal consequência destes dispositivos médicos é a sua colonização por bactérias ou fungos, podendo desta forma gerar infeções sérias como infeções na corrente sanguínea (Tille, 2017). A cultura semi-quantitativa da ponta de cateter pelo método de *Maki* é determinante para avaliar a possibilidade de este ser responsável pela origem de um quadro de bacteriémia ou pela sua colonização por um determinado microrganismo. Quando o cateter é retirado, são cortados 5 cm da parte mais distal, a zona que contacta mais profundamente na pele. Este é enviado em contentor próprio para o laboratório para ser analisado o mais rápido possível.

Com auxílio de uma pinça esterilizada, a ponta do cateter é rodada cinco vezes sobre uma gelose de COS e depois colocada num caldo BHI, sendo que ambos são incubados a  $37^\circ\text{C}$  durante 18-24 horas. Assim, os possíveis microrganismos que estejam no exterior da ponta do cateter desenvolvem-se na gelose COS enquanto que os que estejam no interior são apenas identificados a partir do meio de enriquecimento BHI. No caso de ser pedido, ou necessário, procede-se ao exame micológico em que o rodado é efetuado numa gelose SGC, e incubado nas mesmas condições. Após a incubação quantifica-se o número de colónias no meio COS

em que, se existirem mais de 15 colónias estas são valorizadas e procede-se para ID e TSA. No caso de serem menos de 15 colónias considera-se que o cateter poderá estar colonizado, descartando possíveis contaminações. Também se analisa o caldo BHI que se se apresentar turvo indica que houve crescimento microbiano e é necessário proceder para esfregaço com coloração *Gram* para posterior observação microscópica. Esta observação permite averiguar se os microrganismos isolados em COS são idênticos aos presentes no meio BHI, pois caso contrário, sugere que o interior do cateter poderá apresentar microrganismos diferentes. Nesse sentido, repica-se do BHI para COS e avalia-se o crescimento bacteriano, procedendo mais tarde para a sua identificação definitiva. Note-se que os isolamentos da cultura do cateter são correlacionados com o resultado da hemocultura concomitante, a fim de confirmar que o agente infeccioso responsável pela infeção é o mesmo (Fonseca *et al.*, 2004).

### 3.1.7 – Raspado de Fâneros

Neste tipo de amostras, das quais fazem parte as unhas, pele e cabelo, é realizado exame micológico para pesquisa de dermatófitos. *Trichophyton* spp., *Microsporum* spp. e *Epidermophyton* spp.. Estes são os principais agentes etiológicos responsáveis pelas micoses neste tipo de produtos biológicos. Habitualmente são incapazes de penetrar no tecido subcutâneo, exceto quando o hospedeiro está imunocomprometido (Tille, 2017). O processamento inicia-se com o exame direto a fresco em que é necessário adicionar umas gotas solução de hidróxido de sódio aos raspados sobre uma lâmina. Esta solução é fundamental para quebrar as ligações de queratina e permitir a visualização dos fungos (Mahon e Lehman, 2019). É colocada uma lamela e observa-se ao microscópio. Se forem detetadas hifas, a amostra é positiva. De seguida, é efetuado exame cultural em duas placas de SGC que incubam durante 4 semanas em estufas com temperaturas diferentes, 25°C e 30°C, e em lâmina *Mycoline*. Este meio é constituído por SGC num dos lados da lâmina que permite o crescimento de todos os fungos, e no outro lado por gelose *Sabouraud* com cloranfenicol e actidiona que, graças à actidiona, proporciona o crescimento seletivo de dermatófitos (Tille, 2017). A lâmina é colocada dentro de um tubo próprio e incuba na estufa a 25°C. O crescimento de fungos neste meio é analisado após 48 horas nos dois lados da lâmina. Se existirem fungos com as mesmas características nos dois lados da lâmina indica que estamos perante um dermatófito, que é posteriormente identificado. Caso contrário, se existir apenas crescimento no lado do SGC, consoante as características morfológicas, ou é um fungo leveduriforme ou filamentoso, sendo necessária a sua identificação como já explicado. O crescimento nas placas de SGC é analisado todas as semanas em paralelo com o *Mycoline*, para avaliação de crescimento de fungos até serem considerados negativos.

## 3.2 – Identificação Microbiana e Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana

As características macro e microscópicas das colónias isoladas fornecem “pistas” que permitem chegar a uma identificação presuntiva dos microrganismos possivelmente envolvidos numa determinada infeção. Contudo, o crescimento destes microrganismos requer identificação e caracterização definitivas (Tille, 2017). Todas as metodologias que participam nos testes de identificação microbiana e de suscetibilidade antimicrobiana são descritas a seguir.

### 3.2.1 – Testes Auxiliares à Identificação Microbiana

Muitas vezes é difícil distinguir as colónias apenas pela sua morfologia, ou a coloração de *Gram* é duvidosa e é necessário recorrer a provas auxiliares de identificação. Estas são de fácil execução e interpretação (Tille, 2017). No Setor de Microbiologia, os testes auxiliares mais utilizados são os que determinam a presença de enzimas (catalase, oxidase e urease) e a suscetibilidade a um determinado antimicrobiano (optoquina e vancomicina).

#### Teste da Catalase

Esta enzima decompõe o Peróxido de Hidrogénio ( $H_2O_2$ ) em água e oxigénio. Para verificar a sua presença, coloca-se uma gota de  $H_2O_2$  (conhecida água oxigenada) numa lâmina de vidro e, com uma ansa de plástico, retira-se uma colónia da placa, sendo colocada sobre a gota de  $H_2O_2$ . Posto isto, observa-se se há ou não formação de efervescência ou bolhas correspondente à decomposição do  $H_2O_2$  em água e oxigénio. A produção destas bolhas indica que a reação é positiva, ou seja, as bactérias da colónia possuem a catalase. Pelo contrário, a não formação das bolhas indica que a reação é negativa. Este teste permite a distinção de cocos *Gram*-positivo em que *Staphylococcus* spp. são catalase positiva enquanto que *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp. são catalase negativa (Fonseca et al., 2004; Tille, 2017).

#### Teste da Citocromo Oxidase

A citocromo oxidase participa no transporte de eletrões para o oxigénio nas cadeias de respiração aeróbia, formando água. No Setor, para avaliar a presença desta enzima, recorre-se a tiras comerciais que contêm dicloridrato de tetrametil-*p*-fenilenediamina, um reagente que substitui o oxigénio como aceitador de eletrões. Este, no estado reduzido é incolor mas quando oxidado adquire cor azul-roxo. Quando a citocromo oxidase está presente, o citocromo *c* é oxidado e, por sua vez, oxida o reagente (cor azul-roxo) ficando o citocromo *c* reduzido. Com uma ansa de plástico esterilizada retira-se uma colónia da placa e



coloca-se sobre a tira, efetuando de imediato a leitura do resultado. O aparecimento de cor azul-roxo indica a presença desta enzima, enquanto que o não aparecimento desta cor indica a sua ausência. Este teste é muito utilizado para distinguir os bacilos *Gram*-negativo, como por exemplo: *Enterobacteriaceae* oxidase negativa de *Pseudomonaceae* oxidase positiva (Fonseca et al., 2004; Tille, 2017).

### Teste da Urease

A urease hidrolisa a ureia em amónia, água e CO<sub>2</sub>. A sua presença é determinada com a inoculação dos microrganismos num caldo que contém ureia como fonte primária de carbono. O caldo é incubado a 37° durante 18-24 horas. Se a urease estiver presente, há produção de amónia que alcaliniza o meio e que graças ao indicador de pH, vermelho de fenol, o meio muda de cor de amarelo para rosa. No Setor, este teste é muito utilizado para distinguir colónias beta-galactosidase-negativa em XLD/HEK ou para confirmar a presença de *Proteus* spp. que é urease positiva (Figura 14-A) em relação a *Salmonella* spp. e *Shigella* spp., que são urease negativa (Figura 14-B)(Mahon e Lehman, 2019; Tille, 2017).

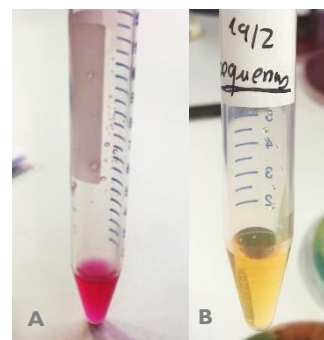


Figura 14 – Teste da Urease.  
Legenda: A-Urease positiva;  
B-Urease negativa. (Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG)

### Teste de Suscetibilidade à Vancomicina

A vancomicina é um antibiótico que atua na parede celular bacteriana em que a maioria das bactérias *Gram*-positivo são suscetíveis e as *Gram*-negativo clinicamente relevantes são resistentes. Este teste de suscetibilidade à vancomicina é de particular importância quando a coloração de *Gram* é incerta e é necessário averiguar a identificação do tipo de *Gram* dos microrganismos em estudo. O teste é efetuado segundo a técnica de *Kirby-Bauer* e o meio é incubado durante 24 horas. Após incubação, avalia-se se há ou não crescimento até ao disco. Qualquer zona de inibição em torno do disco é indicativa dos microrganismos serem suscetíveis à vancomicina e, portanto, existe forte possibilidade de se tratar de bactérias *Gram*-positivo. A ausência de zona de inibição pressupõe a presença de bactérias *Gram*-negativo (Tille, 2017).

### Teste da Optoquina

A optoquina é um antibiótico utilizado para distinguir *Streptococcus pneumoniae* de outros estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos que se agrupam no grupo *Viridans*. *Streptococcus pneumoniae* é sensível à optoquina, apresentando, pela técnica de *Kirby-Bauer*, um halo de inibição superior a 15 mm. Ao analisar a placa, após incubação da estirpe com o disco de



optoquina, se existir um halo de inibição igual ou superior a 15 mm estamos perante *Streptococcus pneumoniae*, enquanto que se o halo for inferior são *Streptococcus*  $\alpha$ -hemolíticos (Tille, 2017).

### 3.2.2 – Biologia Molecular

Os testes de diagnóstico molecular fornecem uma deteção rápida dos agentes infecciosos, sendo bastante úteis quando os microrganismos apresentam um crescimento lento em meios de cultura ou por outro lado, são difíceis de cultivar. Para além disso, este tipo de testes permite que os clínicos tratem o mais rapidamente possível infeções graves com grande probabilidade de risco de vida (Mahon e Lehman, 2019). No Setor de Microbiologia são realizados os testes moleculares descritos na Tabela IX, pela técnica de PCR em tempo real no equipamento *GeneXpert* (Cepheid).

Tabela IX – Testes de Biologia Molecular disponíveis no Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG.

Teste	Amostra	Função
<b>Xpert MTB/RIF Ultra</b>	Expetoração	Deteção de DNA de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e/ou mutações do gene <i>rpoB</i> associados a resistências à rifampicina
<b>Xpert C. difficile BT</b>	Fezes	Deteção de toxinas B (gene <i>tcdB</i> ), toxina binária (gene <i>cdtA</i> ) e deleção no gene <i>tcdC</i>
<b>Xpert Carba-R</b>	Zaragatoa retal	Deteção e diferenciação dos genes associados a resistência aos carbapenemos (carbapenemases KPC, OXA48, NDM, VIM e IPM)
<b>Xpert MRSA/SA Blood Culture</b>	Sangue (hemocultura)	Deteção de DNA de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> Metilina Resistente (gene <i>mecA</i> )
<b>Xpert MRSA NxG</b>	Zaragatoas nasais e Sangue (hemoculturas)*	Deteção de DNA de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> Metilina Resistentes (gene <i>mecA</i> e <i>mecC</i> ) *Confirmação de hemoculturas positivas e despiste de portadores
<b>Xpert Xpress Flu/RSV</b>	Zaragatoa nasofaríngea ou nasal	Deteção e diferenciação de RNA viral dos Vírus Influenza A, Influenza B e Vírus Respiratório Sincial

### 3.2.3 – Sistema de Identificação BD BBL Crystal

*BD BBL Crystal* é um sistema de identificação rápida para bactérias aeróbias Gram-positivo. O inóculo é distribuído por um painel com 30 poços, cada um com um determinado substrato bioquímico/enzimático ligado a substâncias cromogénicas ou fluorogénicas. Este painel é incubado durante 24-48 horas a 37°C, e após esse período a leitura é feita visualmente pela alteração de cor e com auxílio de um equipamento com fonte de luz UV pela presença de aumento de fluorescência em relação a um poço de controlo (Figura 15-A). A cada poço é atribuído um resultado negativo ou positivo consoante a cor/fluorescência (Figura 15-B),

sendo depois somados por colunas os resultados positivos. Aos resultados negativos é atribuído o número zero. Posto isto, determina-se um bionúmero de 10 dígitos. Num software próprio da marca, é colocado este bionúmero e a morfologia (cocos ou bacilos) a fim de se obter uma identificação.

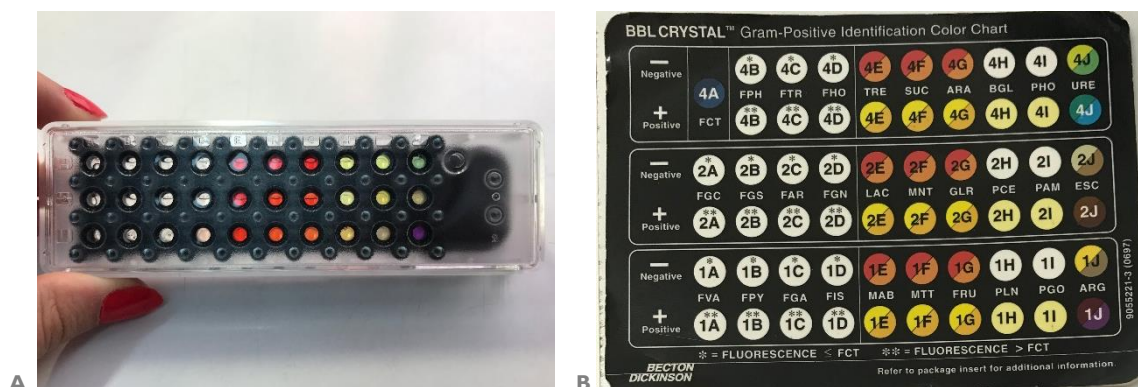


Figura 15 – Sistema de Identificação BD BBL Crystal. Legenda: A-Painel de 30 poços após incubação; B-BD BBL Crystal Panel Viewer que permite a leitura dos poços. (Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG)

Recorre-se a este sistema quando é necessário identificar bactérias Gram-positivo que não estão abrangidas no leque de microrganismos possíveis de identificar no *Vitek 2 Compact 15* ou quando a identificação de um Gram-positivo é duvidosa.

### 3.2.4 – Vitek 2 Compact 15: Identificação Definitiva e TSA

No Setor de Microbiologia, a identificação definitiva da grande maioria das bactérias e leveduras isoladas é realizada no sistema automatizado *Vitek 2 Compact 15* através da utilização de cartas de ID e de TSA. A partir de uma ou mais colónias puras é realizada uma suspensão em 3 mL de solução salina com uma determinada densidade de *McFarland* que depende do tipo de carta. Para chegar à densidade de *McFarland* pretendida utiliza-se um densitómetro. Esta suspensão é semeada em meio COS quando se pretende identificar cocos Gram-positivo, em CLED para bacilos Gram-negativo, em SGC para leveduras, em PVX para bactérias fastidiosas e em SCS para anaeróbios e *Corynebacterium spp.*. Esta sementeira realizada a partir da suspensão permite avaliar a sua pureza, funcionando como um controlo da identificação uma vez que, para esta ser definitiva, o crescimento nestas placas só pode apresentar um tipo de colónias (colónias puras). Caso contrário, tem de se repetir todo o procedimento.

As cartas de identificação, como o próprio nome indica, são cartas que permitem a identificação de microrganismos clinicamente relevantes. Estas são constituídas por 64 poços com diferentes substratos bioquímicos, cuja utilização pelo microrganismo é revelada a partir de reações colorimétricas, chegando assim à sua identificação. As cartas de ID utilizadas no Setor de Microbiologia são: ID GN para bacilos Gram-negativo não fastidiosos, ID GP para

cocos Gram-positivo, ID YST para leveduras, ID NH para *Neisseria* spp. e *Haemophilus* spp. e ID ANC para *Corynebacterium* spp. e anaeróbios.

As cartas de TSA permitem determinar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) e, portanto, a suscetibilidade dos microrganismos a determinados antimicrobianos. No Setor estão disponíveis as cartas: TSA YS08 para leveduras, TSA 355 para *Enterobacteriaceae*, TSA 373 para *Pseudomonaceae* e Gram-negativo multirresistentes, TSA 648 para *Staphylococcus* spp., TSA ST-03 para *Streptococcus*  $\alpha$ -hemolíticos, TSA 586 para *Enterococcus* spp. e *Streptococcus*  $\beta$  ou  $\gamma$ -hemolíticos. Para a utilização destas, é necessário preparar uma nova suspensão a partir da suspensão utilizada para a identificação. Cada carta contém poços com concentrações específicas de determinados antimicrobianos.

Na Figura 16 está representado o esquema que é utilizado no sentido de auxiliar tanto o processo de identificação de microrganismos, como a escolha das cartas de ID e TSA.

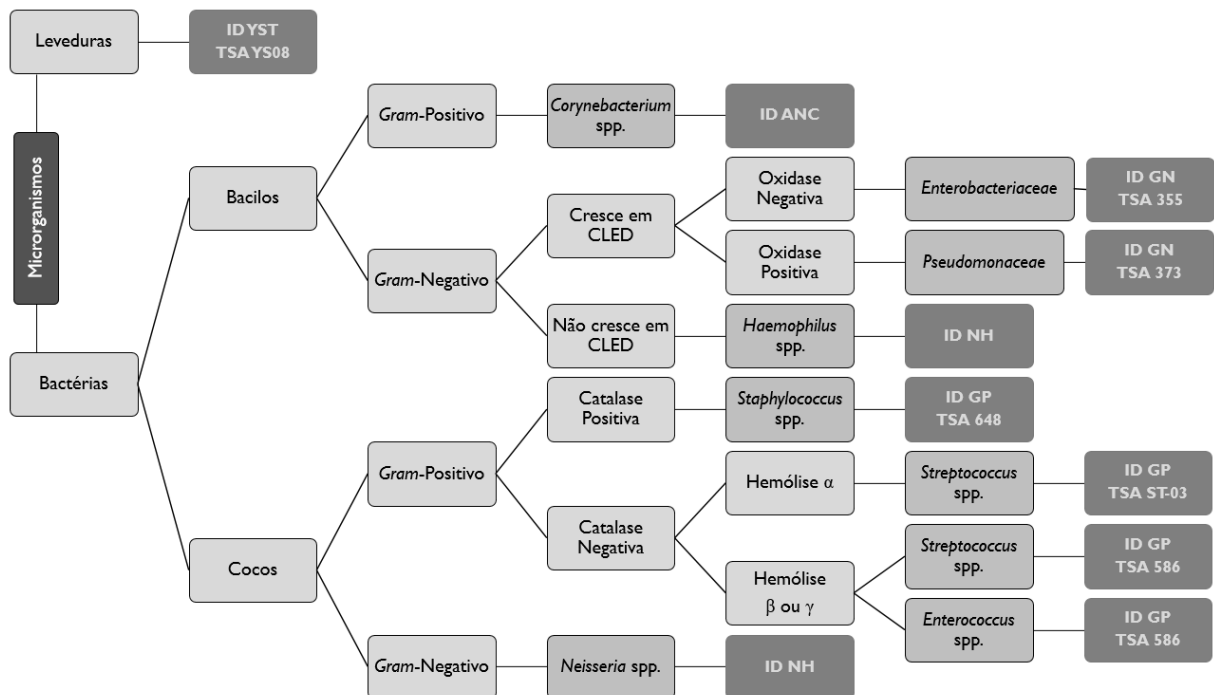


Figura 16 – Esquema utilizado no processo de identificação microbiana com respectivas cartas de ID e TSA. (Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG)

As cartas são colocadas numa rack própria e ficam em contacto com as suspensões preparadas. Depois são colocadas no Vitek 2 Compact 15 (Figura 17) que, em primeiro lugar, as aspira e em segundo, as incuba num compartimento próprio com temperatura controlada. Durante a incubação, o equipamento efetua leituras óticas de 15 em 15 minutos, em que mede a existência que produtos corados/alteração de cor dos poços (cartas ID) e o crescimento bacteriano (cartas TSA).



Figura 17 – Colocação das cartas no respetivo equipamento Vitek 2 Compact 15 da BioMérieux. (Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG)

Num computador, um *software* próprio da casa comercial compara os resultados com uma base de dados e identifica os microrganismos com um valor de percentagem associado à confiança do resultado. Nas cartas de TSA, a partir crescimento bacteriano associado a diluições sucessivas é determinada a CMI baseada numa análise algorítmica. Assim, e de acordo com as normas do EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), obtêm-se os perfis de suscetibilidade em que são identificados os fármacos aos quais os microrganismos são suscetíveis ou resistentes.

### 3.2.5 – TSA Manuais: Método de Kirby-Bauer e E-test

Também são realizados TSA pelo método de *Kirby-Bauer* e *E-test* quando se quer avaliar a suscetibilidade a determinados antibióticos que não estão incluídos nas cartas TSA ou quando estas não estão disponíveis. Como se pode observar na Figura 16, não se utilizam cartas TSA para os microrganismos anaeróbios e fastidiosos, como para *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp. e *Corynebacterium* spp.. O método de *Kirby-Bauer* consiste em testes de difusão em disco, em que são utilizados discos de papel de filtro impregnados com uma concentração conhecida de antibióticos. Quando estes são colocados na superfície de uma placa inoculada, o antibiótico difunde-se pela gelose estabelecendo assim um gradiente de concentração em volta do disco, sendo que a concentração mais alta é a que está mais próxima deste. Após incubação, as bactérias crescem em torno dos discos até onde a concentração do antibiótico é suficientemente alta para inibir o seu desenvolvimento, permitindo assim a deteção de suscetibilidade a este tipo de fármacos utilizando as *Breakpoint Tables* do EUCAST (Tille, 2017).

O procedimento para a realização destes testes começa pela preparação de uma suspensão bacteriana com densidade 0,5 *McFarland* que é semeada pela técnica de sementeira em toalha em gelose *Mueller-Hinton* (MHE) ou gelose *Mueller-Hinton Fastidious* (MHF) para bactérias fastidiosas. MHE é um meio não seletivo, transparente, que suporta o crescimento da maioria das bactérias e é muito utilizado nos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos. No meio MHF, a adição de 5% de sangue de cavalo cria um meio enriquecido para organismos como *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp. e *Streptococcus* spp. (Mahon e Lehman, 2019). Os discos são aplicados na superfície da gelose até um máximo de 5 discos por placa, e as placas são incubadas a 37°C durante 16-20 horas. Após este tempo, procede-se à medição em milímetros dos halos de inibição que, de acordo com as normas do EUCAST, permitem classificar os microrganismos como suscetíveis ou resistentes aos antibióticos correspondentes (Figura 18).



Figura 18 – Método Kirby-Bauer em placas de MHE. (Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG)

O *E-test* consiste no uso de tiras de plástico que de um lado contém o gradiente de concentração do antibiótico e do outro uma escala numérica que indica a concentração do fármaco. As placas MHE são inoculadas como em cima referido, e a tira *E-test* (Figura 19) é colocada no centro da placa que é posteriormente incubada. Após incubação, a interpretação é feita com base na escala numérica onde a inibição do crescimento corresponde a um número que é considerado como a CMI (Tille, 2017). Também neste TSA, os microrganismos são classificados como suscetíveis ou resistentes aos antibióticos de acordo com as normas do EUCAST.

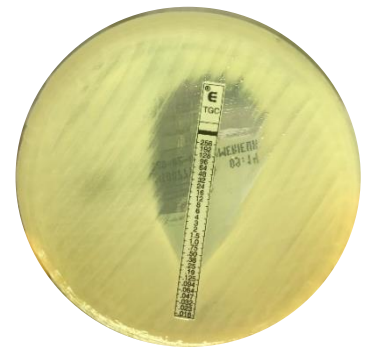


Figura 19 – *E-test* em MHE. (Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG)

### 3.2.6 – Pesquisa de Mecanismos de Resistência: Beta-lactamases de Espectro Alargado e Carbapenemases

Os beta-lactâmicos são dos antibióticos mais utilizados na clínica, sendo por isso os que mais frequentemente são alvo dos mecanismos de resistência por parte das bactérias. A produção de Beta-lactamases de Espectro Alargado (*Extended-Spectrum Beta-Lactamases*, ESBL) constitui um dos principais mecanismos de resistência devido à hidrólise do anel beta-lactâmico. Isto resulta na ausência de eficácia terapêutica por parte das cefalosporinas de terceira e quarta geração, embora a sua atividade seja inibida pelo ácido clavulânico. As ESBL são frequentemente codificadas por genes de plasmídeos. Estes plasmídeos podem carregar genes de resistência a outras classes de antibióticos e, por este motivo, as ESBL estão eventualmente associadas a co-resistência ao cotrimoxazol, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. Em infecções com bactérias produtoras de ESBL, nomeadamente bactérias pertencentes à família das *Enterobacteriaceae*, por vezes a única opção terapêutica é a utilização de carbapenemos. Estes antibióticos apresentam um espectro de atividade mais amplo dentro da classe dos beta-lactâmicos sendo resistentes à maioria das beta-lactamases. Contudo, muitas vezes estas bactérias também são produtoras de carbapenemases, tornando mais difícil

o tratamento das infecções por este tipo de microrganismos (Bertão *et al.*, 2018; Mahon e Lehman, 2019; Paterson e Bonomo, 2005).

No Setor, estes mecanismos de resistência são pesquisados por métodos fenotípicos em microrganismos isolados como: *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Proteus mirabilis*. Para a detecção da produção de ESBL é realizado o Teste de Sinergismo em Duplo Disco, em que são utilizadas cefalosporinas de terceira geração (ceftriaxona e cefotaxima) e um inibidor de beta-lactamases (ácido clavulânico). Quando há produção de ESBL, estas hidrolisam as cefalosporinas que, na presença do inibidor de beta-lactamases, diminui a sua CMI demonstrando a existência de sinergismo (Drieux *et al.*, 2008). Na detecção de produção de carbapenemases é utilizado um disco de faropenemo, um dos antibióticos mais sensíveis e específicos (99% e 94%, respectivamente) para aferir a presença de carbapenemases, uma vez que o hidrolisam (Day *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2014). Para isso, é preparada uma suspensão com densidade 0,5 McFarland, que é semeada em MHE pela técnica de sementeira em toalha. Pelo método de Kirby-Bauer são adicionados os seguintes discos: amoxicilina com ácido clavulânico no centro, ceftriaxona a 20 mm à direita do centro, cefotaxima a 20 mm à esquerda do centro, e faropenemo mais afastado dos outros discos. Incuba-se a placa a 37°C durante 18 horas. Após incubação, a leitura e interpretação dos resultados é realizada conforme representado na Figura 20.

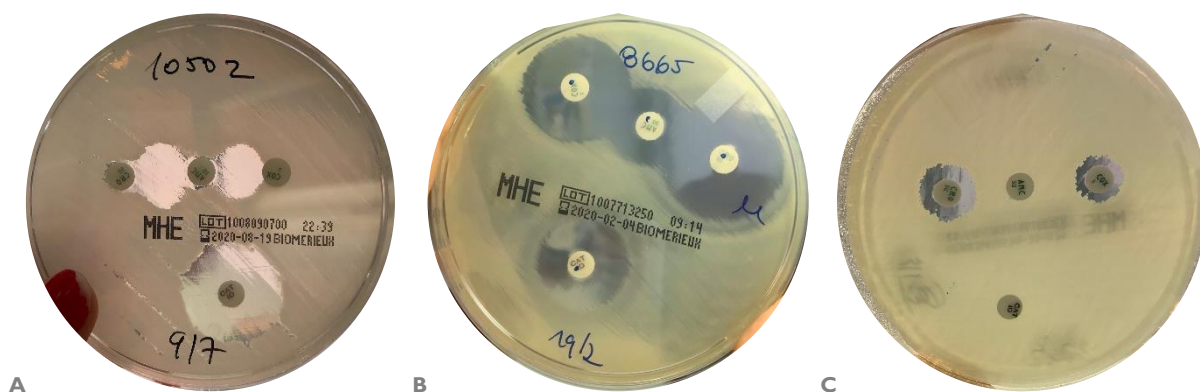


Figura 20 – Pesquisa dos mecanismos de resistência, ESBL e carbapenemases, pelo método de difusão em disco em placa de MHE. Legenda: A-ESBL positivo e faropenemo sensível; B-ESBL negativo e faropenemo sensível; C-ESBL negativo e faropenemo resistente. (Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG)

A presença de sinergismo entre os antibióticos ceftriaxona, amoxicilina com ácido clavulânico e cefotaxima indica a presença de ESBL e, portanto, a bactéria em causa é ESBL positivo (Figura 20-A). Caso contrário, se não houver sinergismo entre os antibióticos, é ESBL negativo (Figura 20-B e C). A presença de halo de inibição em relação ao disco de faropenemo indica que a bactéria inoculada é sensível, não sendo produtora de carbapenemases (Figura 20-A e B). A ausência de halo de inibição indica a resistência ao faropenemo e, portanto, a bactéria produz carbapenemases (Figura 20-C).

## Capítulo IV – Hematologia

A Hematologia engloba o estudo do sangue e de todos os seus componentes, desde a avaliação das células, das moléculas e dos órgãos envolvidos em todo o sistema hematopoiético.

As doenças hemato-oncológicas representam aproximadamente 7 a 9% de todas as neoplasias malignas e caracterizam-se por serem doenças clonais que se originam a partir de uma única célula mutada na medula óssea ou no tecido linfóide periférico. A possibilidade do desenvolvimento deste tipo de doenças pode aumentar de acordo com um conjunto de fatores sejam eles genéticos, geográficos e/ou ambientais (Silva *et al.*, 2016). Tendo em conta o contexto em que se insere este estágio, se por um lado existem as doenças hemato-oncológicas que estão diretamente relacionadas com esta área, por outro lado, muitas vezes surgem complicações do foro hematológico (anemia, leucopenia ou alterações da coagulação) derivadas de outro tipo de neoplasias que, ou pela própria patologia ou pelos tratamentos agressivos de quimio/radioterapia, estas podem conduzir a um maior risco de vida. Posto isto, é necessário monitorizar, de forma minuciosa, estes doentes através de análises de rotina como um “simples” hemograma, seja para auxiliar no ajuste da terapêutica por parte do clínico ou, se for o caso, no melhor diagnóstico/prognóstico, de forma a contribuir para sua melhor qualidade de vida.

O Setor de Hematologia do SPC encontra-se dividido em duas salas: uma sala principal onde as amostras são rececionadas e são realizadas análises de hemograma, velocidade de sedimentação, coloração e observação ao microscópio de esfregaços de sangue periférico e de aspirados de medula óssea; na segunda sala são efetuados os estudos de avaliação da hemóstase, a imunofenotipagem por citometria de fluxo e preparação das amostras para pesquisa e quantificação do gene BCR-ABL por biologia molecular.

Na Figura 21 está representado um esquema geral do circuito que é efetuado pelas amostras biológicas mais recebidas na rotina laboratorial do Setor. À sua chegada, estas são logo rececionadas e separadas consoante o exame pedido pelo clínico e tipo de tubo/anticoagulante. As amostras mais recebidas são as de sangue total em tubo com EDTA-K3 (tampa violeta) para determinação do hemograma e velocidade de sedimentação, e as de sangue total em tubo com citrato de sódio (tampa azul) para avaliação da hemóstase. As provas da coagulação são efetuadas em plasma pobre em plaquetas obtido por centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos. Estes dois anticoagulantes removem o cálcio necessário à cascata da coagulação, ligando os iões numa forma não ionizada (Bain, Bates e Laffan, 2017). Todavia, o



EDTA não altera a morfologia celular mas provoca alterações na estrutura química do fator V, fibrinogénio e trombina, razão pela qual não é utilizado nos estudos da coagulação (Silva *et al.*, 2016). As amostras em tubo com EDTA-K3 são colocadas num agitador até ao momento de serem colocadas numa *rack* e serem inseridas no auto-analisador *Beckman Coulter DxH900 Analyzer* para efetuar a sua análise. Isto permite manter o sangue homogeneizado de modo a evitar a ocorrência de erros na determinação dos vários parâmetros.

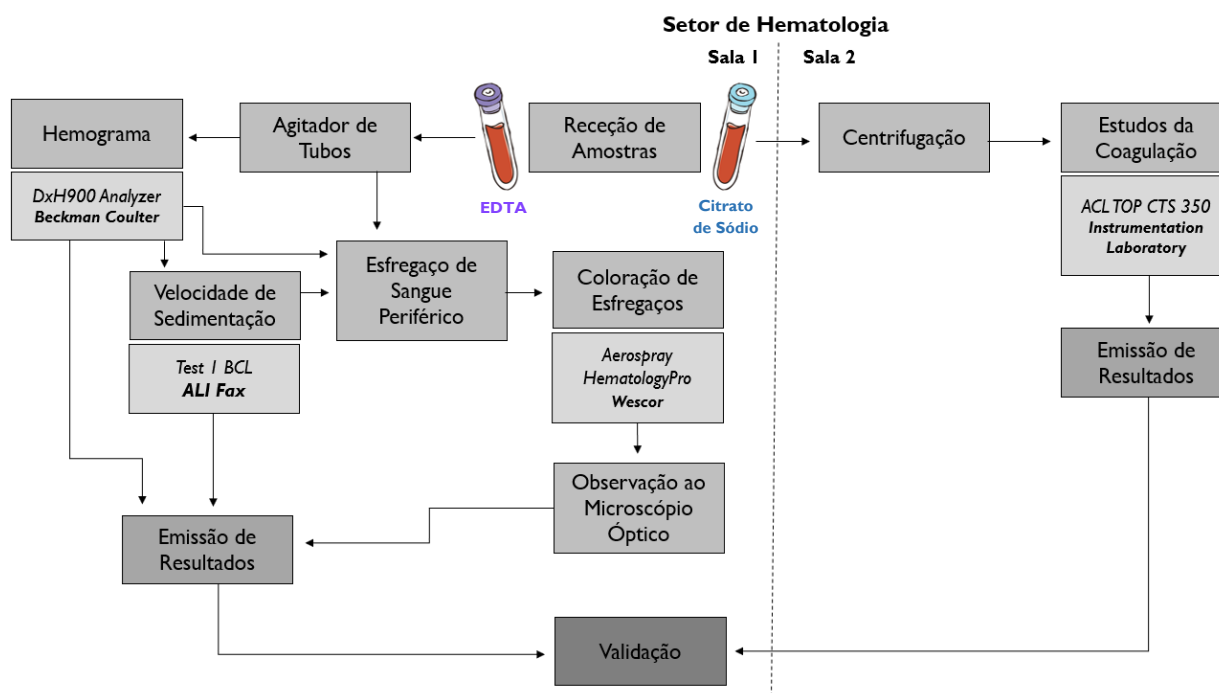


Figura 21 – Circuito geral das amostras biológicas mais recebidas na rotina laboratorial do Setor de Hematologia do SPC-IPOCFG.

#### 4.1 – Hemograma

O hemograma é o exame laboratorial mais pedido pelos clínicos e, portanto, o mais realizado no SPC. Fornece informações quantitativas e qualitativas acerca dos três principais componentes celulares do sangue periférico: eritrócitos, leucócitos e plaquetas.

Além de ser considerado um exame periódico para avaliação do estado de saúde dos utentes, é um exame indispensável ao diagnóstico das diversas patologias hematológicas, no controlo de doenças infecciosas, de doenças crónicas em geral, de emergências médicas, de procedimentos cirúrgicos, bem como no acompanhamento e monitorização de terapêuticas, nomeadamente, quimio e radioterapia. Na maioria dos casos, os primeiros sinais e evidências das doenças hemato-oncológicas são observadas neste exame, demonstrando a sua importância na prática clínica (Bandeira, Magalhães e Aquino, 2014; Silva *et al.*, 2016).





Figura 22 – Auto-analisador Beckman Coulter DxH900 Analyzer. (Setor de Hematologia SPC-IPOCFG)

No Setor de Hematologia, este exame é realizado no auto-analisador *Beckman Coulter DxH900 Analyzer* (Figura 22). Este baseia-se em diferentes metodologias consoante a análise a determinar: a impedância elétrica (Princípio de *Coulter*) para a contagem das células, a tecnologia *Volume-Conductivity-Scatter* (VCS) para a diferenciação dos leucócitos e a espectrofotometria para quantificação da hemoglobina.

Como referido anteriormente, as amostras em tubo de EDTA-K3 são colocadas no equipamento. Primeiro são homogeneizadas e por ordem, são aspirados 165  $\mu\text{L}$  de sangue. Parte desse sangue é diluído num líquido condutor e aspirado por vácuo, fazendo com que cada uma das células suspensas passe através de uma pequena abertura entre os elétrodos que estão submersos em cada lado dessa abertura. Este princípio permite a contagem do número de células pois à medida que cada uma atravessa a abertura, desloca consigo o líquido condutor e cria uma resistência momentânea de passagem de corrente entre os elétrodos. Desta forma são gerados impulsos eletrónicos mensuráveis em que cada impulso corresponde ao número de células e a sua amplitude é proporcional ao volume celular (Bacall, 2009). As contagens celulares das linhas eritrocitária, leucocitária e megacariocítica são realizadas por este princípio.

A contagem diferencial das cinco populações de leucócitos é determinada por tecnologia VCS que se baseia na conjugação de três medições: deteção do volume/tamanho, condutividade e dispersão de uma luz laser que cada tipo de célula provoca. A amostra é aspirada para um módulo onde são adicionados dois tipos de reagente, um reagente lítico que lisa os eritrócitos e um reagente conservante que estabiliza e mantém intacta a forma e núcleo dos leucócitos, permitindo assim a sua contagem. Uma vez preparada a amostra, através de uma válvula de distribuição, as células passam uma a uma na zona de deteção e são iluminadas por um laser de díodo para determinação simultânea do volume, condutividade e dispersão da luz. Para deteção do volume dos leucócitos é utilizada uma corrente direta de baixa frequência, tal como no Princípio de *Coulter*. Pelo contrário, para a avaliação da estrutura interna (complexidade celular) é utilizada uma corrente eletromagnética de alta frequência que atravessa as células. A interação das células com o feixe de luz provoca a sua dispersão, que detetada através de sensores fotovoltaicos. Os resultados são expressos em gráficos bi e tridimensionais (Bacall, 2009; Silva *et al.*, 2016). Por esta tecnologia são também determinadas as contagens de reticulócitos e de eritroblastos.

A determinação da hemoglobina é efetuada por espectrofotometria através da técnica modificada de ciano-meta-hemoglobina. No momento em que o sangue é aspirado para o

módulo de contagem diferencial dos leucócitos, o reagente lítico permite a libertação da hemoglobina que é logo convertida num pigmento estável. Após realizada a contagem diferencial, a amostra diluída e hemolisada é colocada numa cuvette para medição espectrofotométrica a 525 nm. A absorvância é diretamente proporcional à concentração de hemoglobina da amostra (Bain, Bates e Laffan, 2017; Silva *et al.*, 2016).

Na Tabela X estão descritos os parâmetros determinados no auto-analisador onde são efetuados os hemogramas.

Tabela X – Parâmetros determinados no *Beckman Coulter DxH900 Analyzer* e sua descrição.

Parâmetros	Designação	Unidades	Metodologia
<b>Avaliação da Linha Eritrocitária</b>			
<b>RBC</b>	Contagem de Eritrócitos	$\times 10^{12}/L$	Princípio de <i>Coulter</i>
<b>HGB</b>	Hemoglobina	g/dL	Espectrofotometria
<b>HCT</b>	Hematócrito	%	Calculado
<b>MCV</b>	Volume Corpuscular Médio	fL	Derivado do Histograma da Contagem de Eritrócitos
<b>MCH</b>	Hemoglobina Corpuscular Média	pg	Calculado
<b>MCHC</b>	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média	g/dL	Calculado
<b>RDW</b>	Amplitude da Distribuição dos Eritrócitos	%	Derivado do Histograma da Contagem de Eritrócitos
<b>NRBC e NRBC#</b>	Contagem de Eritrócitos Nucleados por 100 Leucócitos e Contagem Absoluta de Eritrócitos Nucleados	/100 WBC e $\times 10^3/\mu L$	Tecnologia VCS
<b>RET e RET#</b>	Contagem Relativa e Absoluta de Reticulócitos	% e $\times 10^3/\mu L$	Tecnologia VCS
<b>Avaliação da Linha Leucocitária</b>			
<b>WBC</b>	Contagem de Leucócitos	% e $\times 10^3/\mu L$	Princípio de <i>Coulter</i>
<b>NE e NE#</b>	Contagem Relativa e Absoluta de Neutrófilos	% e $\times 10^3/\mu L$	Tecnologia VCS (Contagem Relativa)  Calculado (Contagem Absoluta)
<b>LY e LY#</b>	Contagem Relativa e Absoluta de Linfócitos	% e $\times 10^3/\mu L$	
<b>MO e MO#</b>	Contagem Relativa e Absoluta de Monócitos	% e $\times 10^3/\mu L$	
<b>EO e EO#</b>	Contagem Relativa e Absoluta de Eosinófilos	% e $\times 10^3/\mu L$	
<b>BA e BA#</b>	Contagem Relativa e Absoluta de Basófilos	% e $\times 10^3/\mu L$	
<b>Avaliação da Linha Megacariocítica</b>			
<b>PLT</b>	Contagem de Plaquetas	$\times 10^3/\mu L$	Princípio de <i>Coulter</i>
<b>MPV</b>	Volume Médio de Plaquetas	fL	Derivado do Histograma da Contagem de Plaquetas

#### 4.1.1 – Parâmetros de Avaliação da Linha Eritrocitária

A interpretação dos parâmetros da linhagem eritrocitária permite avaliar alterações na produção, no aumento da perda ou na destruição dos eritrócitos, na qual se inclui o estudo de patologias como a anemia e a policitemia. A anemia define-se pela redução da concentração de hemoglobina de acordo com os valores de referência estabelecidos consoante a idade e sexo. Por outro lado, a policitemia corresponde ao aumento da concentração de hemoglobina, com conseqüente aumento do hematócrito (Hoffbrand e Moss, 2016). Ambas as patologias têm causas distintas, sendo necessário o aprofundamento da sua avaliação clínica para chegar a um diagnóstico definitivo.

Estima-se que mais de 50% dos doentes oncológicos desenvolvem anemia. A sua incidência é multifatorial e variável, podendo ocorrer em simultâneo vários mecanismos no mesmo doente. Por um lado, a própria neoplasia sendo uma doença crónica, leva à ativação do sistema imunológico e inflamatório pela produção de citocinas em resposta às células tumorais. Estas citocinas suprimem a eritropoiese, condicionando ou a produção de eritropoietina ou a sua resposta medular, bem como alterações no metabolismo do ferro pela diminuição da sua concentração. Por outro, as terapêuticas anticancerígenas provocam efeitos tóxicos e supressores nas células, principalmente nas células renais produtoras de eritropoietina e nas células progenitoras da linha eritróide na medula óssea. Para além disso, podem causar alterações no metabolismo dos glóbulos vermelhos bem como na sua morfologia (Feliciano, Costa e Melo, 2003). Cada parâmetro de avaliação da linha eritrocitária é apresentado em seguida, com descrição da sua importância na interpretação clínica.

##### Contagem de Eritrócitos

Os eritrócitos são as células mais numerosas que circulam na corrente sanguínea e têm como principal função o transporte de oxigénio dos pulmões às células e o retorno de dióxido de carbono no sentido inverso. Apresentam forma em disco bicôncavo sem núcleo e de cor rosada, graças à hemoglobina (Hoffbrand e Moss, 2016). A sua contagem corresponde ao número total de eritrócitos por unidade de volume de sangue e sempre é interpretada em conjunto com os restantes parâmetros uma vez que a sua avaliação isolada não é conclusiva.

##### Hemoglobina

A hemoglobina é uma proteína especializada que permite aos eritrócitos executar as trocas gasosas. É composta por quatro cadeias polipeptídicas, duas globinas  $\alpha$  e duas globinas  $\beta$ , sendo que cada uma contém um átomo de ferro ligado à protoporfirina para formar o grupo

heme (Hoffbrand e Moss, 2016). A determinação da concentração de hemoglobina, para além de indicar a presença de anemia, também informa acerca da sua intensidade (Silva *et al.*, 2016). Este parâmetro pode estar falsamente aumentado em situações de lipémia, hiperbilirrubinémia ou leucocitose acentuada (Failace, 2009).

### Hematócrito

O hematócrito corresponde à fração ocupada pelos eritrócitos no volume total de sangue da amostra expressa em percentagem (Silva *et al.*, 2016). Este parâmetro é determinado de forma indireta, através da seguinte fórmula:

$$\text{Hematócrito (\%)} = \frac{(\text{Eritrócitos} \times \text{VCM})}{10}$$

### Volume Corpuscular Médio (VCM)

O VCM é um parâmetro que traduz o média do tamanho da população eritrocitária, expresso em fentolitros. No auto-analisador, através do princípio da impedância, são gerados histogramas que ilustram graficamente a contagem celular em função da distribuição do seu tamanho. O VCM é derivado do histograma dos eritrócitos, sendo multiplicado por um fator de calibração. Populações eritrocitárias com tamanho pequeno deslocam o histograma para o lado esquerdo enquanto que as de tamanho maior, o histograma desloca-se mais para a direita (Silva *et al.*, 2016). A sua determinação é útil na classificação das anemias em microcíticas (VCM<80 fL), normocíticas (VCM = 80–95 fL) e macrocíticas (VCM>95 fL), ajudando assim a indicar qual a natureza da possível anomalia subjacente (Hoffbrand e Moss, 2016).

### Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)

A HCM indica, em média, qual a quantidade de hemoglobina presente em cada eritrócito e é expressa em picogramas (Silva *et al.*, 2016). A sua determinação é indireta, sendo calculada através da fórmula:

$$\text{HCM (pg)} = \frac{[\text{Hemoglobina}]}{\text{Eritrócitos}} \times 10$$

### Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)

A CHCM indica, em média, a concentração de hemoglobina presente em cada eritrócito, sendo expressa em grama por decilitro. A sua avaliação é útil na classificação das anemias, permitindo distinguir as anemias normocrómicas de hipocrómicas (Silva *et al.*, 2016). Este parâmetro é determinado indiretamente através da seguinte fórmula:

$$\text{CHCM (g/dL)} = \frac{[\text{Hemoglobina}]}{\text{Hematócrito}} \times 100$$

### Amplitude da Distribuição dos Eritrócitos - *Red Cell Distribution With* (RDW)

O RDW traduz a variação de tamanho da população eritrocitária e é derivado do histograma dos eritrócitos, sendo multiplicado por um fator de calibração e expresso em percentagem. Este parâmetro quando se encontra dentro dos valores de referência indica que os eritrócitos apresentam uma população homogênea em relação ao seu tamanho. No entanto, isto não significa necessariamente que todas as células possuem um tamanho normal. Se a maioria dos eritrócitos forem de pequeno ou grande tamanho, o valor de RDW é normal. Um RDW aumentado indica a presença anisocitose, ou seja, uma maior variabilidade no tamanho dos eritrócitos. Estas alterações estão relacionadas com deficiências nutricionais, como a de ferro, vitamina B12 e folatos (Silva *et al.*, 2016). Posto isto, o RDW também fornece informações que auxiliam na interpretação clínica das anemias.

### Reticulócitos

Os reticulócitos são as últimas células precursoras imediatamente antes de se formarem os eritrócitos maduros. Por outras palavras, são recém-eritrócitos que migram da medula óssea para o sangue periférico e que já não contêm núcleo mas sim RNA ribossômico que vai sendo catabolizado durante 1 a 2 dias. São células ligeiramente maiores e de coloração mais acinzentada ou roxeada quando observados no esfregaço de sangue periférico (ESP) (Failace, 2009; Hoffbrand e Moss, 2016). No auto-analisador, a sua determinação é realizada por coloração com azul de metileno e por tecnologia VCS que correlaciona a imaturidade dos reticulócitos pelo seu volume e dispersão da luz devido à presença de RNA (Silva *et al.*, 2016). Este parâmetro é uma importante ferramenta para a avaliação da atividade regenerativa da medula óssea, mostrando qual a sua capacidade em responder à diminuição da concentração da hemoglobina com a produção de novas células. Assim, nos casos em que há diminuição da contagem de reticulócitos é provável estarmos perante uma anemia por supressão da medula óssea enquanto que o seu aumento indica que a anemia é regenerativa, apontando para causas de hemólise ou de perdas sanguíneas agudas (Feliciano, Costa e Melo, 2003; Silva *et al.*, 2016).

### Eritroblastos

Os eritroblastos são células nucleadas precursoras da linha eritróide cuja diferenciação ocorre na medula óssea e portanto, em condições normais, estas células não estão presentes no sangue periférico (Hoffbrand e Moss, 2016). No auto-analisador, a sua determinação é realizada pela tecnologia VCS e são deduzidos na contagem de leucócitos (eritroblastos/100 leucócitos). Muitas vezes é necessária a observação de ESP para fazer a correção da contagem diferencial de leucócitos, principalmente quando a percentagem de eritroblastos é superior a

5/100 leucócitos (Failace, 2009). Este parâmetro é fundamental para averiguar o prognóstico de patologias tais como, talassémias, doenças mieloproliferativas e tumores sólidos metastáticos da medula óssea (Silva *et al.*, 2016).

#### 4.1.2 – Parâmetros de Avaliação da Linha Leucocitária

Também é parte integrante do hemograma a contagem de leucócitos bem como o seu diferencial, do qual fazem parte a quantificação e avaliação morfológica das diferentes células. Estas podem dividir-se em dois grupos: fagócitos e linfócitos. Dos fagócitos fazem parte os granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e os monócitos que estão relacionados com a resposta imune inata. Os linfócitos são células imunologicamente competentes que auxiliam os fagócitos numa resposta de segunda linha de defesa, a resposta imune adaptativa. Num adulto saudável, os neutrófilos constituem a maioria dos leucócitos em circulação no sangue periférico e desempenham um papel fundamental no mecanismo de defesa do organismo. Na maioria das doenças infecciosas e/ou inflamatórias ocorre neutrofilia ( $>7,0 \times 10^3/\mu\text{L}$ ). Pelo contrário, uma neutropenia ( $<1,8 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) acentuada pode decorrer de tratamentos de quimo/radioterapia ou de insuficiência da medula óssea, com sério comprometimento do sistema imunológico e aumento da predisposição dos doentes a infeções. Os linfócitos são o segundo tipo de leucócitos mais abundante no sangue periférico. A linfocitose ( $>5,0 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) pode estar associada a infeções virais ou bacterianas agudas, leucemias linfóides ou linfomas. As infeções bacterianas normalmente cursam com neutrofilia. Já a linfopenia ( $<1,0 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) pode acompanhar neutropenia nas doenças inflamatórias/infecciosas ou ser causada por terapêuticas de quimo/radioterapia ou imunossupressoras. Os monócitos circulam de forma breve no sangue periférico, exercendo as suas funções nos tecidos como macrófagos. A monocitose ( $>1,2 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) está relacionada com infeções bacterianas crónicas, doenças autoimunes ou neoplasias, como por exemplo, a leucemia mielomonocítica crónica. Os eosinófilos participam nos processos inflamatórios com especial papel nas reações alérgicas, defesa em infeções por parasitas e na reparação tecidual. A eosinofilia ( $>0,6 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) deve-se, muitas das vezes às razões mencionadas, mas também pode estar associada a leucemias. Os basófilos também participam nas reações alérgicas apresentando locais de ligação para a imunoglobulina E e a libertação de histamina por desgranulação da célula. Estas são escassas na corrente sanguínea, no entanto, o seu aumento ( $>0,2 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) está associado à presença de doenças mieloproliferativas (Failace, 2009; Hoffbrand e Moss, 2016).

No Setor de Hematologia, as situações de leucocitose superior a  $20,0 \times 10^3/\mu\text{L}$ , eosinofilia superior a 10%, basofilia superior a 2% ou alarmes que indicam a presença de blastos

são exemplo de quando é necessário avaliar o histórico do doente e, caso se justifique, realizar ESP.

#### 4.1.3 – Parâmetros de Avaliação da Linha Megacariocítica

As plaquetas são fragmentos que derivam do citoplasma dos megacariócitos na medula óssea, não sendo por isso consideradas como células. Num indivíduo adulto saudável, o número total de plaquetas circulantes no sangue varia entre 140 a  $400 \times 10^3/\mu\text{L}$ . Têm como principal função a sua participação nos mecanismos de adesão e agregação na hemostasia primária bem como a interação com os fatores da coagulação na hemostasia secundária. Deste modo estão envolvidas na causa de diversas patologias, seja pela diminuição (trombocitopenia) ou aumento (trombocitose) do seu número. A trombocitopenia é uma das alterações mais frequentes que está associada a sangramento anormal. A causa mais comum é a insuficiência da sua produção na medula óssea. Esta insuficiência pode ser seletiva, como por exemplo a utilização alguns fármacos que pela sua toxicidade conduz à depressão específica dos megacariócitos, ou global, em que todas as linhas são afetadas seja devido tratamentos de quimio/radioterapia ou determinadas patologias como anemia aplástica, leucemia, mieloma múltiplo e outras neoplasias que envolvam alterações na medula óssea. Por outro lado, também pode ocorrer diminuição do número de plaquetas pelo aumento da sua destruição. Habitualmente está associada a alterações imunológicas com produção de autoanticorpos antiplaquetas e pode ser induzida por diversos mecanismos. As trombocitoses são classificadas de causa fisiológica, primária ou secundária. A trombocitose fisiológica pode ocorrer após realização de exercício físico intenso ou na altura do parto em grávidas. Este é um aumento transitório do número total de plaquetas deve-se à sua mobilização e não ao aumento da sua produção. Já a trombocitose de causa primária deve-se ao aumento da sua produção descontrolada e está relacionada com doenças mieloproliferativas tais como trombocitemia essencial, policitemia vera, leucemia mielóide crónica e mielofibrose. A trombocitose de causa secundária ou reacional está associada a processos infecciosos e inflamatórios crónicos (Hoffbrand e Moss, 2016; Silva *et al.*, 2016).

No Setor, quando um hemograma apresenta trombocitopenia que não está de acordo com o histórico do doente, verifica-se se a amostra tem coágulo visível e se sim, tem de se repetir a colheita. Se não, analisam-se os histogramas e efetua-se ESP para avaliar quanto à presença de agregados plaquetares.

## 4.2 – Velocidade de Sedimentação

A Velocidade de Sedimentação (VS) corresponde à distância (medida em milímetros) em que os eritrócitos se depositaram num tubo vertical ao fim de 1 hora. Este parâmetro está diretamente relacionado com a concentração plasmática de proteínas de elevada massa molecular como imunoglobulinas, fibrinogénio ou outras proteínas de fase aguda, uma vez que alteram a viscosidade plasmática. Esta alteração deve-se ao facto de a membrana citoplasmática dos eritrócitos ter carga negativa e criar um potencial de repulsão entre estes que, na presença das proteínas em cima referidas, esse potencial é vencido. Apesar de a VS ser um parâmetro inespecífico, é utilizado como um “sinal biológico” de inflamação em que valores elevados estão relacionados com doenças inflamatórias crónicas, processos infecciosos, neoplasias e gravidez (Hoffbrand e Moss, 2016; Silva *et al.*, 2016).

No Setor de Hematologia, este parâmetro é determinado no analisador automático *Test 1 BCL ALI Fax* (Figura 23). O princípio do seu funcionamento baseia-se na fotometria cinética. Os tubos primários de EDTA são colocados em *racks* próprias e introduzidos no equipamento onde são girados lentamente durante cerca de 2 minutos. No momento de aspiração, o sangue é distribuído num capilar e centrifugado a 20g a 37°C de temperatura. O sistema realiza 1000 leituras durante 20 segundos no comprimento de onda a 950 nm através de um microfotómetro de infravermelhos e um detetor de fotodíodo. São gerados impulsos elétricos relacionados com a agregação de eritrócitos presentes no capilar. Assim, obtém-se uma curva de agregação/sedimentação que através de um algoritmo matemático, é emitido um resultado expresso em milímetros por hora (Cha *et al.*, 2009).



Figura 23 – Analisador automático *Test 1 BCL ALI Fax*. (Setor de Hematologia SPC-IPOCFG)

## 4.3 – Esfregaço de Sangue Periférico

Apesar dos avanços tecnológicos e de automatização dos equipamentos na área da hematologia, o ESP é ainda uma técnica manual imprescindível à rotina laboratorial. A sua análise com observação microscópica constitui um dos exames mais eficientes na avaliação e deteção de alterações morfológicas nos componentes sanguíneos (Silva *et al.*, 2016). No Setor de Hematologia do SPC este exame é realizado quando é pedido pelo clínico ou pelo médico/técnico superior que validam os resultados sempre que os valores de um hemograma e situação clínica do doente o justifiquem. Cada caso é um caso mas de forma geral estes são alguns exemplos de situações que requerem a execução de ESP: valores de hemograma não



concordantes com a história clínica do doente ou discrepantes em relação aos valores de referência, indicação de alterações significativas na morfologia das células (presença de blastos ou plaquetas gigantes), histogramas alterados ou quando a contagem diferencial dos leucócitos está significativamente alterada ou por algum motivo não é realizada.

Para a execução do ESP (Figura 24) começa-se por homogeneizar o sangue no tubo de EDTA com auxílio de uma pipeta. Coloca-se uma gota de sangue num ponto central da extremidade de uma lâmina de vidro. Com auxílio de uma segunda lâmina, esta é colocada em contacto com a primeira lâmina num ângulo de cerca de 45° no qual é arrastada para trás até chegar à gota de sangue (Figura 24-A e B). No momento em que esta fica dispersa sob a largura da lâmina, num movimento rápido e uniforme, a lâmina é deslocada ao longo da extensão da outra obtendo-se assim o esfregaço de sangue (Figura 24-C). Este caracteriza-se por apresentar uma densidade decrescente com borda fina arredondada ou em linha reta (Figura 24-D), caso contrário é necessária a realização de um novo esfregaço. Após efetuada a secagem procede-se para a sua coloração. Para isso, as lâminas são colocadas no equipamento *Aerospray Hematology Pro* (Wescor) que, em apenas alguns minutos, efetua a coloração de *Wright-Giemsa*. Nesta, são utilizados dois corantes distintos: a eosina, corante ácido que tem afinidade para estruturas celulares alcalinas (citoplasma) e o azul de metileno, corante básico que cora estruturas ácidas (núcleo). Assim, torna-se possível a observação e distinção da morfologia das células sanguíneas ao microscópio ótico.

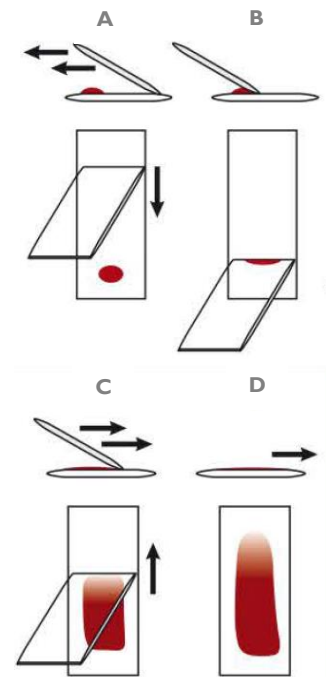


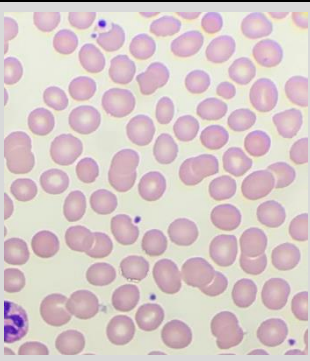
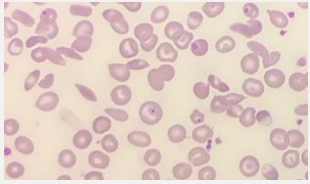
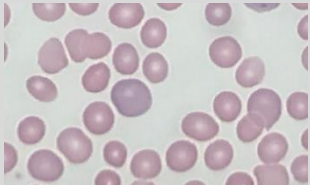
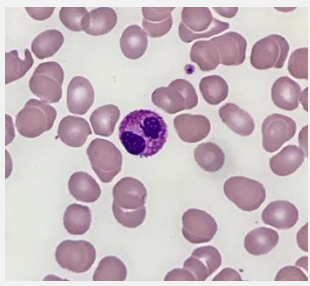
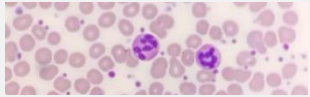
Figura 24 – Procedimento para execução de um esfregaço de sangue periférico. [Retirado do livro *Hematologia Laboratorial – Teoria e Procedimentos*, Artmed Editora S.A. (2016)]

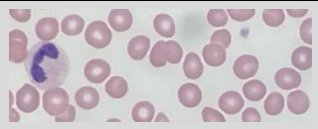
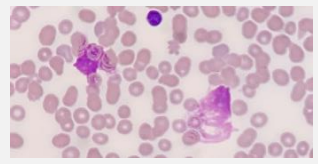
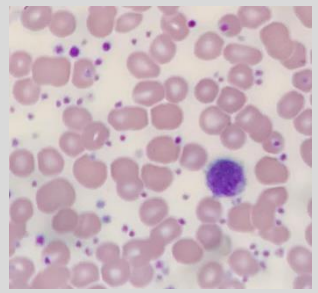
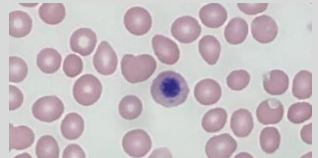
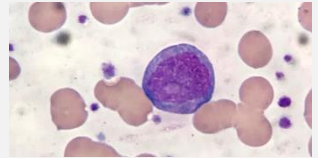
No microscópio ótico, a primeira observação é realizada com a objetiva de 10x e consiste na avaliação do aspeto geral do ESP. Na segunda é utilizada a objetiva de 50x com imersão em óleo para efetuar a observação da morfologia e/ou contagem celular. Para isso é necessário encontrar um bom campo que corresponde à zona onde os eritrócitos se apresentam uniformemente distribuídos. Consoante o caso, e de acordo com o relatório emitido pelo auto-analisador, a observação microscópica do ESP é assim direcionada. Todas as alterações analisadas são descritas de forma criteriosa. O exame microscópico começa pela avaliação da linhagem eritrocitária com observação do tamanho, forma e coloração dos eritrócitos e da linhagem megacariocítica pelo número, tamanho, forma e presença de agregados de plaquetas. Em seguida, é observado com maior detalhe a morfologia dos

diferentes tipos de leucócitos e o seu número quando é necessário executar a contagem diferencial. A contagem diferencial dos leucócitos é efetuada com auxílio de um instrumento contador de células, onde são contadas e diferenciadas 100 células. Quando observada a presença de células precursoras de qualquer uma das linhagens, esta é sempre identificada com indicação da sua prevalência.

Na Tabela XI estão descritos alguns exemplos de alterações morfológicas que podem ser observadas no ESP com ilustração das mesmas.

Tabela XI – Exemplos de alterações morfológicas das células sanguíneas e sua descrição.

Alterações Morfológicas	Descrição	Exemplos de Condições Clínicas Associadas	Observação do ESP (Fotografias retiradas no Setor de Hematologia SPC-IPOCFG)
<b>Avaliação da Linha Eritrocitária</b>			
Anisocitose	Presença de diferentes tamanhos dos eritrócitos	Eritropoiese Anormal	
Macrocitose	Eritrócitos de tamanho superior ao normal	Anemia Megaloblástica, Síndromes Mielodisplásicas, Tratamento com Hidroxiureia, Alcoolismo e Doenças Hepáticas Crônicas	
Microcitose	Eritrócitos de tamanho inferior ao normal	Anemia por Deficiência de Ferro, Talassémias, Casos severos de Anemia de Doenças Crônicas	
Poiquilocitose	Variação da forma dos eritrócitos que consoante uma forma específica pode ser associada a uma determinada patologia	Anemias, Talassémias, Mielofibrose e Síndromes Mielodisplásicas	
Policromasia	Eritrócitos com colorações ligeiramente distintas	Anemias Hemolíticas, Tratamento de Anemia por Deficiência de Ferro ou Anemia de Doenças Crônicas, Esferocitose e Regeneração da Medula Óssea	
<b>Avaliação da Linha Leucocitária</b>			
Granulações Tóxicas	Granulações primárias que decorrem da abreviação do processo de proliferação dos neutrófilos	Processos Infeciosos	
Neutrófilos Hiposegmentados	Diminuição da segmentação (2 lóbulos) ou não segmentação do núcleo dos neutrófilos	Síndrome Pelger-Huet, Doenças Mieloproliferativas, Síndromes Mielodisplásicas e Quimioterapia	
Neutrófilos Hipersegmentados	Neutrófilos com 6 ou mais lóbulos	Anemia Megaloblástica, Síndromes Mielodisplásicas e Quimioterapia	

Granulócitos Hipogranulares ou Agranulares	Granulócitos que perderam os grânulos citoplasmáticos	Síndromes Mielodisplásicas	
Manchas de Gumprecht	Fenômeno que ocorre <i>in vitro</i> na execução do ESP em que células linfóides rompem e libertam os seus núcleos	Neoplasias Hematológicas, nomeadamente Leucemia Linfóide Crónica	
<b>Avaliação da Linha Megacariocítica</b>			
Anisocitose Plaquetar	Plaquetas com diferentes tamanhos	Estados Pré-trombóticos, Leucemia Mielóide Aguda/Crónica, Anemia Megaloblástica, entre outras	
Plaquetas Gigantes	Plaquetas de grande dimensão (aproximadamente do tamanho dos eritrócitos)	Doenças Mieloproliferativas, Púrpura Trombocitopénica Idiopática, Síndrome de Bernard-Soulier e Anomalia de May-Hegglin	
<b>Presença de Células Imaturas</b>			
Eritroblastos	Células precursoras da linhagem eritróide que em situações fisiológicas apenas se encontram na medula óssea	Talassémias, Doenças Mieloproliferativas e Tumores Sólidos Metastáticos da Medula Óssea	
Células Imaturas da Linhagem Mielóide	Presença de Mieloblastos, Promielócitos, Mielócitos ou Metamielócitos no sangue periférico	Infeções Bacterianas, Doenças Inflamatórias Agudas, Doenças Mieloproliferativas, Rejeição Aguda de Transplantes e Gravidez	

#### 4.4 – Avaliação Laboratorial da Hemóstase

A hemóstase corresponde ao equilíbrio entre a hemorragia e a coagulação através de mecanismos controlados que são fundamentais quando ocorre um dano vascular. Isto depende de complexas interações entre plaquetas, fatores da coagulação, inibidores fisiológicos da coagulação, sistema fibrinolítico e células endoteliais dos vasos sanguíneos. Quando estes componentes funcionam de forma harmoniosa, o equilíbrio é mantido. Caso contrário, o seu desequilíbrio leva ao surgimento de hemorragias ou formação de trombos, podendo acarretar sérios riscos para os doentes (Hoffbrand e Moss, 2016; Silva *et al.*, 2016).

Para avaliação laboratorial da hemóstase são utilizadas amostras de sangue colhidas para tubo com citrato de sódio. Os tubos são centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos para obtenção de plasma pobre em plaquetas. De seguida, as amostras centrifugadas são colocadas no equipamento ACL TOP CTS 350 da *Instrumentation Laboratory* (Figura 25). Este baseia-se no princípio da turbidimetria em que durante a formação do coágulo de fibrina há

aumento da turvação e, conseqüentemente, uma mudança na intensidade do feixe de luz que é transmitido. Assim, o auto-analizador deteta e mede a alteração da densidade ótica num determinado período de tempo que corresponde ao tempo que a amostra leva a formar o coágulo (Bain, Bates e Laffan, 2017; Milos *et al.*, 2009).



Figura 25 – Equipamento ACL TOP CTS 350 da Instrumentation Laboratory. (Setor de Hematologia SPC-IPOCFG)

No Setor de Hematologia são realizados os testes de rotina que fornecem informações preliminares no diagnóstico dos distúrbios da coagulação e os testes mais específicos que permitem definir qual a patologia em causa. Destes últimos fazem parte a determinação de fatores da coagulação, D-dímeros, fibrinogénio, antitrombina, proteínas C e S, e deteção do anticoagulante lúpico.

#### 4.4.1 – Parâmetros de Rotina

Os parâmetros utilizados na rotina laboratorial para avaliação da hemóstase são o tempo de protrombina, o tempo de tromboplastina parcial ativada e o tempo de trombina. Estes assentam no modelo clássico da cascata da coagulação que se divide nas vias intrínseca (ou de contacto) e extrínseca (ou dependente do fator tecidual), sendo que ambas convergem numa via comum após ativação do fator X (Figura 26).

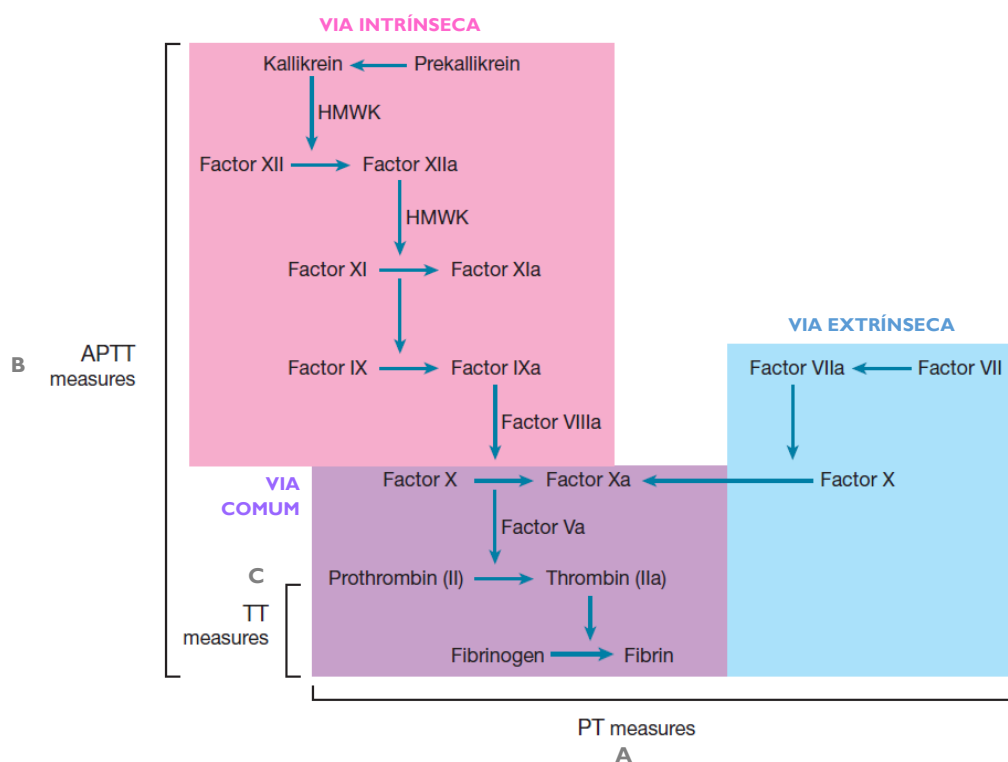


Figura 26 – Representação esquemática das vias intrínseca, extrínseca e comum da cascata da coagulação e parâmetros laboratoriais subjacentes. Legenda: A-Tempo de Protrombina; B-Tempo de Tromboplastina Parcial ativada; C-Tempo de Trombina; HMWK-Cininogénio de Alto Peso Molecular.

[Adaptado do livro Hoffbrand's Essencial Haematology, 7ª ed., Wiley-Blackwell (2016)]

### Tempo de Protrombina (TP)

O TP avalia os fatores VII, X, V, protrombina (fator II) e fibrinogénio (fator I) subjacentes às vias extrínseca e comum da cascata da coagulação (Figura 26-A).

A determinação deste parâmetro consiste na adição de tromboplastina (equivalente à tromboplastina tecidual) e cálcio para a ativação da coagulação, uma vez que o cálcio foi retirado da amostra por ação do citrato de sódio. Assim, a tromboplastina ativa o fator VII que por sua vez ativa o fator X e transforma a protrombina em trombina. Esta leva à ativação do fator V que se liga ao fator X, aumentando a ativação de trombina que atua no fibrinogénio para formação do coágulo de fibrina. O tempo necessário para a formação do coágulo é determinado em segundos. Quando este é mais prolongado e o TTPa é normal, indica que existe deficiência do fator VII (Silva *et al.*, 2016).

Este parâmetro é realizado para pré-operatórios, investigação de coagulopatias ou na monitorização de anticoagulantes orais. Nas primeiras duas situações, o resultado do TP é expresso em segundos juntamente com o valor do controlo. Na monitorização de varfarina, antagonista de vitamina K, o valor de TP é também apresentado através do *International Normalized Ratio* (INR) (McPherson e Pincus, 2011). O INR é calculado através do quociente entre o valor de TP do doente e um valor de TP controlo de referência elevado ao *International Sensitivity Index* (ISI), conforme demonstrado na seguinte fórmula:

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

As tromboplastinas que incorporam o reagente neste teste não apresentam sempre a mesma sensibilidade à redução de atividade dos fatores dependentes de vitamina K (terapêutica com varfarina), resultando em valores de TP com diferenças significativas. Para reduzir esta variabilidade, a Organização Mundial de Saúde adotou um sistema em que as tromboplastinas comerciais são comparadas com uma tromboplastina padrão internacional através do ISI. Por este motivo, a monitorização de terapêuticas com anticoagulantes orais é avaliada pelo INR (Silva *et al.*, 2016).

### Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa)

O TTPa avalia os fatores VIII, IX, XI, XII, X, V, protrombina e fibrinogénio subjacentes às vias intrínseca e comum da cascata da coagulação (Figura 26-B).

Neste teste é adicionado um reagente com fosfolípidos plaquetares sintéticos, sílica (ativador de contacto) e cálcio para iniciarem o processo de coagulação. A sílica ativa os

fatores da fase de contacto (XII, XI, cininogénio de alto peso molecular e pré-caliceína) para ativação em cascata dos fatores IX, X, protrombina e trombina. Esta ativa os fatores VIII, V e XI. O fator VIII ativado complexa com o fator IX e com os fosfolípidos para ativarem definitivamente o fator X e protrombina. O cálcio é adicionado para desencadear a formação da rede de fibrina e, portanto, o coágulo. O resultado é determinado em função do tempo necessário para a formação do coágulo em segundos. Tempos alargados do parâmetro TTPa com TP normal apontam para alterações dos fatores intervenientes na via intrínseca da cascata da coagulação, aumentando o risco hemorrágico. Este parâmetro é utilizado como teste pré-operatório, investigação de coagulopatias e monitorização de terapêuticas com heparina de elevado peso molecular (McPherson e Pincus, 2011; Silva *et al.*, 2016).

No Setor de Hematologia, para averiguar se o tempo alargado de TTPa se deve à deficiência de um fator da coagulação ou à presença de um inibidor é realizada uma mistura do plasma do doente com uma *pool* de plasma normal na proporção 1:1. Efetua-se de novo o teste e se houver correção do TTPa indica a existência de deficiência de um dos fatores da coagulação. Caso contrário, e excluindo o facto de o doente estar sob terapêutica anticoagulante, indica a presença de um inibidor. Nesta situação, procede-se ao despiste da presença do anticoagulante lúpico que, contrariamente ao seu nome, apresenta elevado risco trombótico. Este é explicado no ponto 4.4.2 – Detecção do Anticoagulante Lúpico.

A alteração simultânea dos parâmetros TP e TTPa para tempos prolongados pode indicar deficiência de fatores da via comum, deficiência de vitamina K, doença hepática, coagulação intravascular disseminada ou uso de terapias anticoagulantes (McPherson e Pincus, 2011).

### Tempo de Trombina (TT)

O TT avalia a conversão do fibrinogénio em fibrina (Figura 26-C). Para isso, à amostra é adicionada uma solução de trombina que atua sobre o fibrinogénio para formação do coágulo. O tempo necessário para a formação do coágulo é medido em segundos. Este parâmetro permite determinar deficiências qualitativas/quantitativas de fibrinogénio ou a inibição da trombina pelo uso de anticoagulantes como a heparina (Silva *et al.*, 2016).

#### 4.4.2 – Detecção do Anticoagulante Lúpico

O Anticoagulante Lúpico (AL) corresponde a autoanticorpos dirigidos contra proteínas plasmáticas com afinidade para fosfolípidos. Por este motivo, a sua presença causa o prolongamento do tempo de TTPa, uma vez que depende dos fosfolípidos plaquetares para iniciar a coagulação. Isto explica o seu nome dado como anticoagulante, mas na verdade não o é, uma vez que se encontra associado à ocorrência de fenómenos de trombose. É encontrado em variadas doenças autoimunes e, por vezes, em indivíduos saudáveis (Campos e Santos, 2011).

No Setor, para pesquisa do AL é necessário separar o plasma da amostra já centrifugada para um tubo secundário. Este é centrifugado uma segunda vez a 3000 rpm durante 10 minutos para obter plasma sem plaquetas. De seguida, são realizados dois testes com princípios distintos: um teste tipo veneno de víbora de Russel diluído (dRVVT) e outro do tipo TTPa mas mais sensível - *Silica Clotting Time* (SCT). O veneno de víbora de Russel, na presença do fator V, protrombina, cálcio e fosfolípidos, leva à ativação do fator X para formação do coágulo. Quando o AL está presente, liga-se aos fosfolípidos e impede a ação do veneno de víbora de Russel (Bain, Bates e Laffan, 2017).

Para cada um destes testes são realizadas duas medições, uma de *screening* e outra confirmatória. Na medição de *screening* é utilizado um reagente com baixa concentração de fosfolípidos enquanto que na medição confirmatória, o reagente contém fosfolípidos em excesso. A baixa concentração de fosfolípidos resulta no prolongamento do tempo até à formação do coágulo. O excesso serve para garantir que não há alargamento desse tempo, provocando a neutralização dos anticorpos (Bain, Bates e Laffan, 2017).

O resultado é obtido numa razão entre medição *screening*/confirmatória. A amostra é positiva quando o valor da razão é superior a 1,2 em apenas um dos testes ou em ambos.

#### 4.5 – Gene BCR-ABL

O cromossoma de Filadélfia é resultante da translocação t(9;22) em que parte do oncogene ABL presente no cromossoma 9 é transferido para o gene BCR (*Breakpoint Cluster Region*) no cromossoma 22 (Figura 24-A). Assim, é formado um gene de fusão BCR-ABL1 que codifica uma tirosina cinase com atividade desregulada, a proteína p210 (Figura 27-B). Este gene é detetável em 95% dos doentes com Leucemia Mielóide Crónica (LMC) (Bain, Bates e Laffan, 2017; Hoffbrand e Moss, 2016).

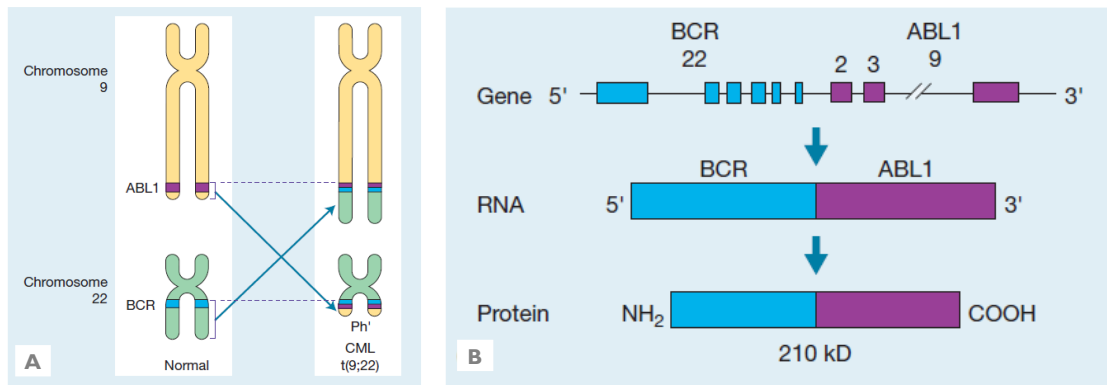


Figura 27 – Cromossoma de Filadélfia. Legenda: A-Translocação t(9;22); B-Gene BCR-ABL1.  
[Adaptado do livro Hoffbrand's Essencial Haematology, 7<sup>a</sup> ed., Wiley-Blackwell (2016)]

No Setor de Hematologia, a pesquisa e quantificação deste gene é realizada através de biologia molecular no equipamento *GeneXpert (Cepheid)* em amostras de sangue em tubo de EDTA. As amostras são processadas e colocadas num cartucho próprio para, posteriormente, entrarem no equipamento. A sua metodologia baseia-se na utilização de ensaios de PCR em tempo real quantitativo para deteção e quantificação do gene BCR-ABL1.

Este teste é utilizado tanto no diagnóstico como no seguimento (tratamento e prognóstico) dos doentes com LMC.



## Capítulo V – Caso Clínico

Mulher, 73 anos, diagnosticada com Trombocitemia Essencial (TE) JAK2 V617F positiva em Novembro de 2019.

A TE é uma doença mieloproliferativa caracterizada pelo aumento exponencial da contagem de plaquetas em sangue periférico superior a  $450 \times 10^3/\mu\text{L}$ , devido à excessiva proliferação megacariocítica e hiperprodução de plaquetas (Hoffbrand e Moss, 2016). Habitualmente, os restantes parâmetros do hemograma não apresentam alterações significativas, no entanto pode existir aumento da contagem de glóbulos vermelhos e brancos. Em termos epidemiológicos, é uma doença rara com incidência de 2-3 novos casos/100.000 habitantes/ano sendo a maioria diagnosticados entre os 50-60 anos de idade, independentemente do sexo. Mais de metade destes doentes são assintomáticos e a maior parte são diagnosticados em análises de rotina pelo marcado aumento da contagem de plaquetas no hemograma. Os restantes são identificados em sequência de acidentes trombóticos e/ou hemorrágicos, pois a função plaquetar está comprometida (Swerdlow *et al.*, 2008).

A mutação JAK2 V617F está presente na maioria das neoplasias mieloproliferativas, sendo positiva entre 40-50% dos casos de TE, estando envolvida na desregulação da proliferação celular a partir de *stem cells* hematopoieticas. Embora esta mutação não seja

Tabela XII – Resultados laboratoriais a 29/07/2020. (SPC-IPOCFG)

Análise	Resultados	Valores de Referência	Unidades
Setor de Hematologia			
<b>Hemograma</b>			
Leucócitos	10.1	4.0 – 11.0	$\times 10^3/\mu\text{L}$
Neutrófilos	65.0 % 6.6	1.8 – 7.0	$\times 10^3/\mu\text{L}$
Linfócitos	19.0 % 1.9	1.0 – 5.0	$\times 10^3/\mu\text{L}$
Monócitos	10.0 % 1.0	0.1 – 1.2	$\times 10^3/\mu\text{L}$
Eosinófilos	1.0 % 0.1	0.0 – 0.6	$\times 10^3/\mu\text{L}$
Basófilos	3.0 % 0.3	0.0 – 0.2	$\times 10^3/\mu\text{L}$
Mielócitos	2.0 % 0.2		$\times 10^9/\text{L}$
<b>Eritrócitos</b>	<b>3.59</b>	4.5 – 6.5	$\times 10^{12}/\text{L}$
Hemoglobina	12.3	12.0 – 16.0	g/dL
Hematócrito	<b>39.8</b>	40.0 – 54.0	%
VCM	<b>110.9</b>	85.0 – 95.0	fL
HCM	<b>34.2</b>	27.0 – 32.0	pg
CHCM	30.9	32.0 – 36.0	g/dL
RDW	15.2	11.5 – 14.5	%
<b>Plaquetas</b>	<b>1678</b>	140 – 400	$\times 10^3/\mu\text{L}$
<b>VS</b>	<b>63</b>	$\leq 20$	mm/h

específica desta doença, é a que tem maior incidência quando comparada com outras (Tefferi e Barbui, 2016).

A 29 de Julho de 2020, a doente vem a consulta de Hematologia Clínica, encontrando-se sob hidroxiureia (HU) 1g/dia. As análises requisitadas ao SPC e respetivos resultados encontram-se na Tabela XII. De acordo com os resultados do hemograma, observa-se uma trombocitose evidente característica da patologia e contagem de leucócitos normal com basofilia e presença de mielócitos. Estas alterações estão relacionadas com doenças mieloproliferativas (Langabeer e Haslam, 2017). A contagem eritrocitária encontra-se ligeiramente abaixo dos

valores de referência, sendo que a concentração de hemoglobina está normal. O VCM está aumentado, indicando uma macrocitose sem anemia associada. É provável que esta diminuição da contagem de eritrócitos e macrocitose esteja relacionada com a HU (Randi *et al.*, 2005). Este fármaco inibe a síntese de ADN de forma não seletiva tendo uma toxicidade bastante significativa, com grande probabilidade de ocorrer mielossupressão (Jinna e Khandhar, 2019). Por este motivo, é necessário monitorizar regularmente doentes que estejam sob HU por hemograma. A patologia justifica a velocidade de sedimentação aumentada (Bain, Bates e Laffan, 2017). A observação do esfregaço de sangue periférico evidenciou, trombocitose marcada, anisocitose plaquetar com presença de plaquetas gigantes, macrocitose eritrocitária, alguns neutrófilos hiperlobulados e raros mielócitos (Figura 28).

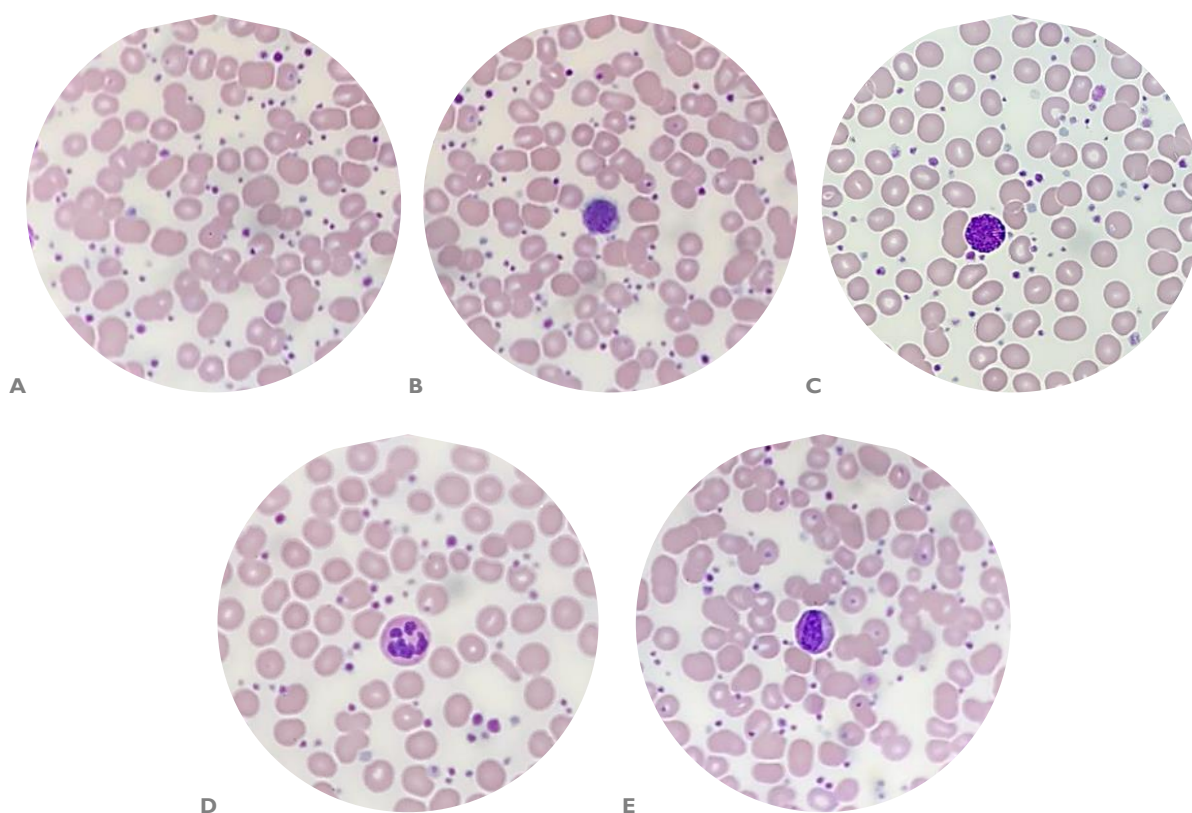


Figura 28 – Visualização microscópica do esfregaço de sangue periférico (objetiva de 50x). Legenda: A-Anisocitose Plaquetar; B-Plaqueta gigante; C-Basófilo; D-Neutrófilo hiperlobulado; E-Mielócito. (Setor de Hematologia SPC-IPOCFG)

No dia 6 de Agosto, doente volta à instituição a consulta não programada por febre persistente, ficando em internamento para avaliação clínica. Os resultados laboratoriais (Tabela XIII) do hemograma revelam leucopenia acentuada, ligeira anemia macrocítica e valores de plaquetas dentro dos valores de referência. É provável que estes sejam consequência da eficácia do tratamento com HU. Os valores de proteína C reativa ultrasensível e de procalcitonina apresentam-se bastante elevados. A proteína C reativa é uma proteína de fase aguda de comportamento positivo que em níveis elevados pressupõe a presença de processos inflamatórios. A procalcitonina apresenta-se muito elevada em infeções

graves como bacteriemia/fungemia, sendo utilizada para a monitorização deste tipo de infeções (Andriolo, Costa e Novo, 2004).

Tabela XIII – Resultados laboratoriais a 6/08/2020.  
(SPC-IPOCFG)

Análise	Resultados	Valores de Referência	Unidades
<b>Setor de Hematologia</b>			
<b>Hemograma</b>			
Leucócitos	<b>1.7</b>	4.0 – 11.0	×10 <sup>3</sup> /μL
Neutrófilos	48.6 % <b>0.8</b>	1.8 – 7.0	×10 <sup>3</sup> /μL
Linfócitos	47.8 % <b>0.8</b>	1.0 – 5.0	×10 <sup>3</sup> /μL
Monócitos	2.9 % <b>0.0</b>	0.1 – 1.2	×10 <sup>3</sup> /μL
Eosinófilos	0.2 % <b>0.0</b>	0.0 – 0.6	×10 <sup>3</sup> /μL
Basófilos	0 % <b>0.0</b>	0.0 – 0.2	×10 <sup>3</sup> /μL
Eritrócitos	<b>3.34</b>	4.5 – 6.5	×10 <sup>12</sup> /L
Hemoglobina	<b>11.7</b>	12.0 – 16.0	g/dL
Hematócrito	<b>37.3</b>	40.0 – 54.0	%
VCM	<b>111.7</b>	85.0 – 95.0	fL
HCM	<b>35.0</b>	27.0 – 32.0	pg
CHCM	<b>31.4</b>	32.0 – 36.0	g/dL
RDW	14.2	11.5 – 14.5	%
Plaquetas	200	140 – 400	×10 <sup>3</sup> /μL
VS	<b>52</b>	<=20	mm/h
<b>Setor de Imunologia/Hormonologia</b>			
Proteína C reativa (ultra sensível)	<b>19.60</b>	<=0.30	mg/dL
Procalcitonina	<b>31.37</b>	<=2.00	ng/mL
<b>Setor de Microbiologia</b>			
<b>Sumária de Urina</b>			
Densidade	1.020	1.016 – 1.022	
pH	5.0	4.8 – 7.4	
Leucócitos	<b>500</b>	0 – 10	
Nitritos	<b>Positivo</b>		
Proteínas	<b>30</b>	0 – 10	mg/dL
Glucose	<b>300</b>	0 – 30	mg/dL
Corpos Cetónicos	Negativo		
Urobilinogénio	I	0 – I	mg/dL
Bilirrubina	0.3	0.0 – 0.2	mg/dL
Eritrócitos	<b>250</b>	0 – 5	/μL
Cor	Amarelo		
Aspeto	<b>Turvo</b>		
<b>Sedimento Urinário</b>			
Células Epiteliais	Raras		
Eritrócitos	<b>10-20 /campo</b>		
Leucócitos	<b>&gt;20 /campo</b>		
Outros	<b>Alguns piócitos e bacteriúria elevada</b>		

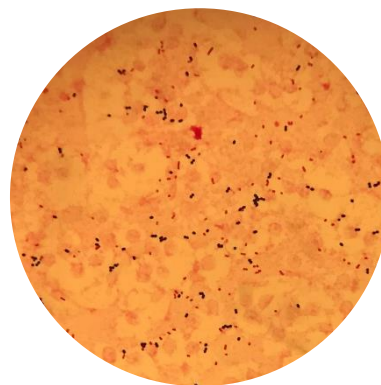
No Setor de Microbiologia foram recebidos dois frascos de hemocultura para aeróbios e uma amostra de urina. Procedeu-se primeiro à urocultura em CLED e CNA e em segundo à sumária de urina.

Passadas cerca de 24 horas, no dia 7 de Agosto, ambos os frascos para hemoculturas positivaram. Procedeu-se ao seu processamento com repicagem para meios COS e incubação, e esfregaço sanguíneo para coloração de Gram. A observação microscópica revelou a presença simultânea de cocos Gram-positivo e de bacilos Gram-negativo (Figura 29), confirmada nos dois esfregaços provenientes de diferentes frascos.

De acordo com os resultados da sumária de urina, esta é fortemente sugestiva de infeção devido à presença de leucócitos, nitritos e sangue confirmada com a observação do sedimento ao microscópio. A urocultura é positiva com contagem igual ou superior a 10<sup>5</sup> UFC/mL em meio CLED, com predominância de dois tipos de colónias diferentes, pelo aspeto *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp.. Procedeu-se para identificação e TSA com utilização das cartas ID GN com TSA 355 para a bactéria Gram-negativo, e ID GP com TSA 586 para a Gram-positivo.

No dia 8 de Agosto, são analisados os meios de COS provenientes da repicagem dos frascos de hemocultura que apresentam crescimento bacteriano de dois tipos de colónias

distintos, no qual se procede à sua identificação. Os resultados do ID e TSA da urocultura identifica *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*, ambos sensíveis a amoxicilina com ácido clavulânico. No dia 9 de Agosto, verifica-se que os resultados de ID e TSA das hemoculturas identificam os mesmos microrganismos com o mesmo perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos.



Os microrganismos responsáveis pela infeção urinária e pela bacteriémia são os mesmos, sendo assim possível concluir que a origem desta seja proveniente da ITU.

Figura 29 – Observação ao microscópio ótico (x100) do esfregaço sanguíneo com coloração de Gram da hemocultura. (Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG)

Cerca de 40% dos doentes com infeções do trato urinário superior adquirem bacteriémia, sendo *Escherichia coli* o agente infeccioso mais comum (Mahon e Lehman, 2019).

Qualquer doença infecciosa contribui para a elevada morbidade e mortalidade de doentes oncológicos, uma vez que tanto a patologia maligna como os tratamentos resultam na modificação dos mecanismos de defesa imunitária. As doenças hemato-oncológicas, inevitavelmente, apresentam maior predisposição a infeções pela substituição da medula por células neoplásicas que em associação a quimioterapia resultam na diminuição da imunidade humoral, celular e do número de neutrófilos (Caeiro, 2009). Este caso clínico demonstra mesmo isso, a maior suscetibilidade dos doentes oncológicos em adquirirem infeções por agentes patogénicos oportunistas.

## Capítulo VI – Conclusão

Este ano 2020 foi totalmente diferente daquilo que eu imaginaria. Ingressei no estágio a Dezembro de 2019 e a Março de 2020, devido ao Estado de Emergência sucedido pela pandemia mundial por SARS-CoV-2, vi-o interrompido por tempo indeterminado. Meses depois, em Junho, o IPOCFG considerou que havia condições de segurança para regressar. Assim, pude cumprir o tempo de estágio proposto passando em todas as áreas clínicas conforme inicialmente planeado.

Para mim, este estágio curricular correspondeu ao “ponto alto” da aplicação prática dos conhecimentos teóricos adquiridos no Mestrado em Análises Clínicas. A minha experiência no SPC do IPOCFG foi, no geral, bastante positiva. Possibilitou a minha integração na rotina laboratorial e o contacto direto com profissionais de saúde qualificados (médicos, técnicos superiores de saúde e técnicos superiores de diagnóstico e terapêutica) que, para além de me orientarem, também me transmitiram confiança para participar, ganhar autonomia e desenvolver o meu sentido crítico. Não só foi uma mais valia para pôr em prática, aprender e consolidar os conhecimentos em todas as áreas clínicas, como para adquirir experiência em termos profissionais.

Termino esta etapa com a certeza de que dei o meu melhor e que ainda tenho muito mais para aprender, uma vez que as Análises Clínicas são uma área muito abrangente e sempre em constante atualização.



## Referências Bibliográficas

- AARNOUTSE, Romy *et al.* - **The Clinical Link between Human Intestinal Microbiota and Systemic Cancer Therapy**. International Journal of Molecular Sciences. Vol. 20, 7 (2019) 1–34.
- ANDRIOLO, Adagmar; COSTA, Roberta Pasianotto; NOVO, Neil Ferreira - **Pró-calcitonina e proteína C reativa em processos infecciosos graves**. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. Vol. 40, 3 (2004) 169–174.
- ARDITO, Fausta *et al.* - **Evaluation of BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT 960) Automated System for Drug Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis**. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 39, 12 (2001) 4440–4444.
- ASHAKIRAN, S.; SUMATI, M. E.; MURTHY, N. K. - **A study of pre-analytical variables in clinical biochemistry laboratory**. Clinical Biochemistry. Vol. 44, 10–11 (2011) 944–945.
- ATAY, Aysenur *et al.* - **Clinical biochemistry laboratory rejection rates due to various types of preanalytical errors**. Biochemia Medica. Vol. 24, 3 (2014) 376–382.
- BACALL, Nydia S. - **Analisador automático hematológico e a importância de validar novos equipamentos em laboratórios clínicos**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. Vol. 31, 4 (2009) 218–220.
- BAIN, Barbara J.; BATES, Imelda; LAFFAN, Mike A. - **Dacie and Lewis Practical Haematology**. 12<sup>a</sup> Ed. United Kingdom: Elsevier, 2017. ISBN 978-0-7020-6696-2.
- 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. Vol. 7, 3 (2014) 403–408.
- BERTÃO, Manuela V. *et al.* - **Estirpes Produtoras de Beta Lactamases de Espectro Alargado: A Realidade num Hospital Central**. Medicina Interna. Vol. 25, 3 (2018) 179–185.
- CAEIRO, Fátima - **O papel da neutropenia no prognóstico do doente oncológico com pneumonia adquirida na comunidade**. Revista Portuguesa de Pneumologia. Vol. 15, 4 (2009) 736–739.

- CAMPOS, Maria Manuel; SANTOS, Isabel Reis - **Síndrome de Hipoprotrombinémia - Anticoagulante Lúpico**. Acta Médica Portuguesa. Vol. 24, 3 (2011) 611–616.
- CHA, Choong-Hwan *et al.* - **Erythrocyte sedimentation rate measurements by TEST I better reflect inflammation than do those by the Westergren method in patients with malignancy, autoimmune disease, or infection**. American Journal of Clinical Pathology. Vol. 131, 2 (2009) 189–194.
- COSTA, Ronaldo Rodrigues; SILVA, Marcio Roberto; GONÇALVES, Isabel Cristina - **Diagnóstico laboratorial da tuberculose: Revisão de literatura**. Revista Médica Minas Gerais. Vol. 8, 5 (2018) 197–206.
- DAY, Kathryn M. *et al.* - **Use of Faropenem as an Indicator of Carbapenemase Activity in the Enterobacteriaceae**. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 51, 6 (2013) 1881–1886.
- DRIEUX, L. *et al.* - **Phenotypic detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide**. Clinical Microbiology and Infection. Vol. 14, 1 (2008) 90–103.
- FAILACE, Renato - **Hemograma: Manual de Interpretação**. 5ª Ed. Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 2009. ISBN 978-85-363-2081-6.
- FELICIANO, Amélia; COSTA, Agostinho; MELO, Maria José - **Anemia no Doente Oncológico**. Revista Portuguesa de Pneumologia. Vol. 9, 2 (2003) 117–128.
- FONSECA, Ana *et al.* - **Orientações para a elaboração de um Manual de Boas Práticas em Bacteriologia**. Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Portugal: Programa Nacional de Controlo de Infeção (2004).
- HOFFBRAND, A. Victor; MOSS, Paul A. H. - **Hoffbrand's Essencial Haematology**. 7ª Ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2016. ISBN 978-1-118-40867-4.
- HU, Fupin *et al.* - **Faropenem Disks for Screening of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae**. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 52, 9 (2014) 3501–3502.
- IPO COIMBRA – Serviço Nacional de Saúde. **História do IPO de Coimbra** [Acedido a 25 de Maio de 2020]. Disponível na Internet: <http://www.ipocoimbra.min-saude.pt/category/institucional/caracterizacao-institucional/>.



- JINNA, Sruthi; KHANDHAR, Paras B. - **Hydroxyurea Toxicity**. Treasure Island (Florida): StatPearls, 2019, atualização a 15 de Agosto de 2020. [Acedido a 18 de Agosto de 2020]. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30725894>.
- KHAN, Hassan Ahmed; BAIG, Fatima Kanwal; MEHBOOB, Riffat - **Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance**. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. Vol. 7, 5 (2017) 478–482.
- LANGABEER, Stephen E.; HASLAM, Karl. - **Molecular Investigation of a Suspected Myeloproliferative Neoplasm in Patients with Basophilia**. Journal of clinical and diagnostic research: JCDR. Vol. 11, 4 (2017) 1.
- MACIEL, Carla; CÂNDIDO, Hugo - **Infecção hospitalar: principais agentes e drogas administradas**. Revista Eletrônica de Ciências. Vol. 3, 1 (2010) 33–41.
- MAHON, Connie R.; LEHMAN, Donald C. - **Textbook of Diagnostic Microbiology**. 6<sup>a</sup> Ed. Missouri: Elsevier, 2019. ISBN 978-0-323-48218-9.
- MCPHERSON, Richard A.; PINCUS, Matthew R. - **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 22<sup>a</sup> Ed. Philadelphia: Elsevier, 2011. ISBN 978-1-4377-0974-2.
- MILOS, M. *et al.* - **Evaluation and performance characteristics of the coagulation system: ACL TOP analyzer – HemosIL reagents**. International Journal of Laboratory Hematology. Vol. 31, 1 (2009) 26–35.
- MONTEIRO, J. A. - **Infeções nosocomiais. Alguns aspectos**. Acta Médica Portuguesa. Vol. 6 (1993) 135–140.
- MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. - **Microbiologia Médica**. 7<sup>a</sup> Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. ISBN 978-85-352-7978-8.
- PATERSON, David L.; BONOMO, Robert A. - **Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update**. Clinical Microbiology Reviews. Vol. 18, 4 (2005) 657–686.
- RANDI, Maria L. *et al.* - **Safety profile of hydroxyurea in the treatment of patients with Philadelphia-negative chronic myeloproliferative disorders**. Haematologica. Vol. 90, 2 (2005) 261–262.
- ROJO-MOLINERO, Estrella *et al.* - **Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica**. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Vol. 33, 6 (2015) 404–410.

- SANTOS, Adriano Palhari Dos; JUNIOR, Gerson Zanusso - **Controle de Qualidade em Laboratórios Clínicos**. Revista Uningá. Vol. 45 (2015) 60–67.
- SILVA, Paulo Henrique Da *et al.* - **Hematologia Laboratorial: Teoria e Procedimentos**. Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 2016. ISBN 978-85-8271-260-3.
- SWERDLOW, Steven H. *et al.* - **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. 4<sup>a</sup> Ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2008. ISBN 978-92-832-2431-0.
- SYDNOR, Emily R. M.; PERL, Trish M. - **Hospital Epidemiology and Infection Control in Acute-Care Settings**. Clinical Microbiology Reviews. Vol. 24, 1 (2011) 141–173.
- TEFFERI, Ayalew; BARBUI, Tiziano - **Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management**. American Journal of Hematology. Vol. 92, 1 (2016) 94–108.
- TILLE, Patricia M. - **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology**. 14<sup>a</sup> Ed. Missouri: Elsevier, 2017. ISBN 978-0-323-35482-0.