



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Beatriz Maria Borlido Pereira

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas orientada
pela Professora Doutora Sara Margarida dos Santos Domingues e pelo
Dr. Nuno Alexandre Costa Ferreira da Cunha e apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.**

Setembro de 2023



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Beatriz Maria Borlido Pereira

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas orientada
pela Professora Doutora Sara Margarida dos Santos Domingues e pelo
Dr. Nuno Alexandre Costa Ferreira da Cunha e apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.**

SETEMBRO DE 2023

“Um cientista no seu laboratório não é um mero técnico: ele é uma criança que enfrenta fenômenos naturais que o impressionam como se fossem contos de fadas.”

Marie Curie

Agradecimentos

A toda a minha família pelo apoio e em especial aos meus pais pelo suporte não só financeiro, mas emocional, ao longo de toda a vida e em particular nesta que é uma jornada tão importante e desafiante; por toda a paciência, carinho, cuidado e disponibilidade, mas principalmente por acreditarem sempre em mim, muito obrigada.

Ao Dr. Nuno Cunha, meu orientador externo, por todo o apoio e ajuda na integração no estágio no IPOCFG e a todo o pessoal técnico do Serviço de Patologia Clínica Laboratorial, pela forma como me receberam e pela ajuda fundamental que foram durante a minha passagem por esta instituição.

À Dr.^a. Sara Domingues, minha orientadora interna, por toda a ajuda e orientação dada na correção e melhoramento deste relatório de estágio.

À Dr.^a. Ana Miguel Matos, com quem tive o prazer de privar durante o estágio no âmbito da minha licenciatura em Biologia e mais tarde como coordenadora do MAC, por todo o apoio e disponibilidade.

À Bárbara Pires, minha colega de mestrado e de estágio, por todas as conversas e desvaneios na hora de almoço, mas principalmente pelo companheirismo de todas as horas ao longo destes meses de estágio e por seres o exemplo a seguir.

A todos os meus amigos, os que conheço desde sempre e os que Rugby me deu o prazer de conhecer, mas em especial ao núcleo de amigos que Biologia me deu, e à família que criamos aqui, sem os quais estes anos não teriam sido a mesma coisa.

Ao Francisco Santos, sem o qual esta jornada não tinha tido metade da intensidade, por me incentivar a ser sempre a minha melhor versão e nunca me deixar acomodar, mas mais do que isso por ser um porto de abrigo nesta cidade que me acolheu e que vou levar para sempre no coração.

A todos que de alguma forma fizeram parte deste processo o meu muito obrigada, levarei sempre um bocadinho de cada um comigo para onde quer que o futuro me leve.

Índice

Agradecimentos	7
Abreviaturas	15
Resumo	17
Abstract	17
Introdução	19
Caracterização do local de estágio	20
Serviço de Patologia Clínica Laboratorial.....	20
Fase Pré-Analítica	21
Fase Analítica	21
Fase Pós-Analítica	21
Controlo de Qualidade	21
Microbiologia	23
Meios de Cultura	24
Exame Macroscópico.....	26
Exame Microscópico	26
Estudos Realizados:.....	29
• Exame Cultural Bacteriológico:	29
• Exame Cultural Micológico:.....	29
• Exame Parasitológico:	30
• Identificação de Microrganismos:	30
• Testes de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA):	31
• Biologia molecular:.....	32
• Provas Bioquímicas clássicas:	32

Amostras Biológicas	34
• Urina:.....	34
• Sangue (Hemocultura):	35
• Pontas de cateter:	36
• Fezes:.....	36
• Secreções respiratórias:.....	37
• Exsudados purulentos (superficiais e profundos):.....	38
• Líquidos serosos:	39
Casos Clínicos	40
Hematologia	47
Provas realizadas.....	48
• Hemograma:.....	48
• Velocidade de Sedimentação (VS):	53
• Esfregaço de Sangue Periférico:	53
• Medulograma:.....	54
• Provas de Coagulação:.....	55
• Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo:.....	59
• Biologia Molecular:.....	59
Casos Clínicos	60
Bioquímica Clínica	66
Provas Realizadas:.....	66
• Calcímetro (ABL 800 Flex):.....	66
• Gasómetro (ABL 800 FLEX):.....	67
• Atellica CH930:.....	67
• Técnicas Manuais:.....	69
Imunologia e Hormonologia	70

Marcadores tumorais:.....	71
Conclusão	73
Referências Bibliográficas	74

Índice de Tabelas

Tabela 1: Lista dos principais equipamentos do Setor da Microbiologia no SPCL do IPOCFG e respectivas funções/especificidades.....	23
Tabela 2: Lista dos principais equipamentos do Setor da Microbiologia no SPCL do IPOCFG e respectivas funções/especificidades.....	24
Tabela 3: Lista de cartas de identificação utilizadas para o equipamento vitek, no SPCL do IPOCFG.	30
Tabela 4: Lista de cartas dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos utilizadas para o equipamento vitek, no SPCL do IPOCFG.....	31
Tabela 5: Critérios de Murray-Washington para a avaliação da qualidade das amostras de expetoração.....	38
Tabela 6: Antibiograma obtido pelas cartas de TSA a partir das colónias isoladas de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42
Tabela 7: Antibiograma obtido pelas cartas de TSA a partir das colónias isoladas de <i>P. aeruginosa</i>	43
Tabela 8: Lista dos principais equipamentos do Setor da Hematologia no SPCL do IPOCFG e respectivas funções/especificidades.....	47
Tabela 9: Quadro resumo das alterações na concentração de hemoglobina e possível patologia associada a cada alteração	49
Tabela 10: Quadro resumo das alterações no volume corpuscular médio e possível patologia associada a cada alteração.	50
Tabela 11: Quadro resumo das alterações na hemoglobina corpuscular média e possível patologia associada a cada alteração.	50
Tabela 12: Quadro resumo das alterações quantitativas dos leucócitos e possível patologia associada a cada alteração.	51
Tabela 13: Quadro resumo das alterações morfológicas (poiquilocitoses) dos eritrócitos e patologias mais comuns associadas a cada alteração.	54
Tabela 14: Parâmetros analíticos efetuados no SPCL do IPOC no contexto do caso clínico 3.	60
Tabela 15: Parâmetros analíticos efetuados no SPCL do IPOC no contexto do caso clínico 4.	63
Tabela 16: Lista dos principais equipamentos do Setor da Bioquímica no SPC do IPOCFG e respectivas funções/especificidades.....	66

Tabela 17: Quadro resumo dos parâmetros realizados pelo aparelho Atellica no setor da Bioquímica do SPCL do IPOC..... 67

Tabela 18: Lista dos principais equipamentos do Setor da Imunologia e Hormonologia do SPC do IPOCFG e respetivos métodos/funções. 70

Índice de Figuras

Figura 1: Esquema orientador da identificação de bactérias e realização de TSA utilizado no SPCL do IPOCFG 27

Figura 2: A – Esfregaço de expetoração corada pela técnica de Kinyoun e observada ao microscópio ótico na ampliação de 500x; B – Ampliação do esfregaço em A para observação de bacilos ácido-álcool resistentes. 28

Figura 3: A – Meio de Sabouraud com crescimento de fungos leveduriformes; B – Meio de Sabouraud com crescimento de fungos filamentosos. 30

Figura 4: A – Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos manual para a pesquisa de perfis de suscetibilidade pelo método de difusão em discos de antibióticos, em gelose MH; B – Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos manual para testar a sensibilidade a antibióticos pelo método de difusão em gradiente (E-test), em gelose MH. 32

Figura 5: A – Observação do esfregaço da expetoração corado pela coloração de Gram ao microscópio ótico numa ampliação de 500x; B – Ampliação do esfregaço em A para observação de leucócitos polimorfonucleares (1), cocos de Gram-positivo (2) e bacilos de Gram-negativo (3) 41

Figura 6: A – Colónias puras de *S. aureus* em cultura no meio de COS; B – Colónias puras de *P. aeruginosa* em cultura no meio de COS..... 42

Figura 7: Colónias puras de *P. aeruginosa* em cultura no meio COS..... 43

Figura 8: A – Observação de várias colónias lactase positiva no meio de cultura HEK; B – Observação de várias colónias lactase positiva no meio de cultura XLD 44

Figura 9: Teste imunocromatográfico positivo para a pesquisa de *C. difficile* 45

Figura 10: Esquema resumo da cascata de coagulação 56

Figura 11: A – Esfregaço de sangue periférico numa ampliação de 40x com recurso ao microscópio ótico; B – Ampliação da área marcado do esfregaço em A para visualização de célula em alvo (1), célula em lágrima (2), ovalócitos (3) e neutrófilo (4) 62

Figura 12: Perfil eletroforético das hemoglobinas, com pico de 96,4% da fração Hb A (1) e pico de 3,6% da fração Hb A2 (2).	62
Figura 13: A – Esfregaço de sangue periférico numa ampliação de 40x com recurso ao microscópio ótico. B – Ampliação da área marcada do esfregaço em A para visualização de eritroblastos (1), plaquetas gigantes (2), neutrófilos com alterações da segmentação nuclear (3), formas imaturas da linha mielóide (4)	64

Abreviaturas

AL – Anticoagulante lúpico

APC – Proteína C ativada

BAAR – Bacilos Ácido-Álcool resistentes

bcr-abl – *Breakpoint cluster region-Abelson Leukemia*

BHI – Caldo cérebro-coração do inglês *brain-heart infusion*

CC – Caldo de Carne

CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média

CHUC – Centro Hospitalar Universitário de Coimbra

CLED – Gelose de cistina, lactose e défice em eletrólitos

CNA – Gelose Columbia com colistina e ácido nalidíxico

COS – Gelose Columbia suplementada com 5% de sangue de carneiro

CRP – Proteína C Reativa

DD – D-dímeros

DGS – Direção geral de saúde

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPO - Eritropoietina

EUCAST – *European Committee on Antimicrobial susceptibility Testing*

FER - Ferritina

GDH – Glutamato desidrogenase

GGT – Gama-glutamil transferase

GN – Gram negativo

HbA1c – Hemoglobina glicada

HCM – Hemoglobina corpuscular média

HEKT – Gelose Hektoen

HGB – Concentração de hemoglobina

HPT – Haptoglobina

HTC -Hematócrito

IPOCFG – Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil

KV – Gelose de Shaedler suplementada com canamicina e vancomicina

LBA – Lavado bronco-alveolar

LLC – Leucemia linfocítica crónica

LMC – Leucemia mieloide crónica

LMMC – Leucemia mielomonocítica crónica

MCK – Gelose MacConkey
MH – Gelose de Mueller-Hinton
MHF – Gelose de Mueller-Hinton fastidious
MIC – Concentração inibitória mínima do inglês *minimal inhibitory concentration*
MRSA/SA – *Staphylococcus aureus* meticilina resistente/ *Staphylococcus aureus*
MSSA - *Staphylococcus aureus* meticilina sensível
MTB – *Mycobacterium tuberculosis*
PC – Proteína C
PCR – Reação em cadeia da polimerase do inglês *polymerase chain reaction*
PDW – Índice de dispersão do volume plaquetar
PLT – Contagem plaquetar
PMN - Polimorfonucleares
PS – Proteína S
PVX – Gelose chocolate + PolyVitex
RBC – Contagem eritrocitária
RDW – Índice de dispersão do volume celular
RPR – Reagina plasmática rápida
RTC – Contagem de reticulócitos
RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real do inglês *real time polymerase chain reaction*
SCS – Gelose de Shaedler
SGC2 – Gelose de Sabouraud com gentamicina e cloranfenicol
SPCL – Serviço de Patologia Clínica Laboratorial
TDT – Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica
TP – Tempo de protrombina
TSA – Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos
TSS – Técnicos Superiores de Saúde
TT – Tempo de trombina
TTPa – Tempo de tromboplastina parcial ativado
UFC – Unidades formadoras de colônias
VCM – Volume corpuscular médio
VS – Velocidade de sedimentação
WBC – Contagem leucocitária
XLD – Gelose de Desoxicolato-lisina-xilose

Resumo

O presente relatório refere-se ao estágio realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas. Este estágio teve o seu início a 16 de janeiro de 2023 e o seu término em 28 de julho do mesmo ano, e foi desenvolvido no Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil. Este relatório diz respeito à atividade desenvolvida nos vários setores do Serviço de Patologia Clínica Laboratorial, nomeadamente Microbiologia, Hematologia, Bioquímica Clínica e Imunologia, aos conhecimentos adquiridos e à sua integração e importância no contexto clínico. Dois setores, Microbiologia e Hematologia, foram alvo de maior aprofundamento, com uma exposição mais detalhada dos parâmetros determinados e da interpretação de casos clínicos.

Palavras-chave: Análises clínicas, Microbiologia, Hematologia

Abstract

This report refers to the internship carried out within the framework of the Master's degree in Clinical Analysis. This internship began on January 16, 2023 and ended on July 28 of the same year, and was developed at the Portuguese Institute of Cancer Coimbra Francisco Gentil. This report concerns the activity carried out in the various sectors of the Clinical Laboratory of the Pathology Service, namely Microbiology, Hematology, Biochemistry and Immunology, the knowledge acquired and its integration and importance in the clinical context. Two sectors, Microbiology and Hematology, were the subject of greater development, with a more detailed exposition of the parameters determined and the interpretation of clinical cases.

Keywords: Clinical analysis, Microbiology, Hematology

Introdução

A área das análises clínicas é muito vasta e multidisciplinar, e é nesta necessidade de uma aprendizagem multifacetada, mas especializada do diagnóstico laboratorial que o Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra se foca.

Faz assim parte do plano de estudos deste mestrado, um estágio curricular de modo a que seja possível aos estudantes não só consolidar todo o conhecimento adquirido, mas também conhecer a dinâmica e por em prática o seu conhecimento na realidade do dia-a-dia dos profissionais desta categoria tão nobre.

O laboratório de análises clínicas é essencialmente definido como o local onde determinada amostra permite obter inúmeras informações valiosas não só para o diagnóstico clínico, mas também para o prognóstico, tratamento e prevenção de doença.

Na minha opinião, esta definição não estando errada, não demonstra a total complexidade e importância do mundo que é as análises clínicas, onde vários tipos de amostras, incontáveis parâmetros e uma infinidade de resultados são obtidos através de uma quantidade ínfima de amostra e se cruzam com o objetivo final de ajudar o doente. É de salientar que a todo este processo está inerente uma responsabilidade diária partilhada por toda a equipa que trabalha num laboratório de análises clínicas.

O presente relatório é relativo ao estágio realizado no Serviço de Patologia Clínica Laboratorial (SPCL) do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (IPOCFG), no qual, durante o período de cerca de seis meses, me foi possibilitado fazer parte da equipa, acompanhando e participando ativamente em todas as fases do processo deste a receção das amostras (fase pré-analítica) até a validação dos resultados (fase pós-analítica).

O tempo de estágio foi dividido pelos setores da Microbiologia, Hematologia, Bioquímica e Imunologia. No entanto os setores da Microbiologia e Hematologia foram alvo de maior aprofundamento, tanto da parte teórica como prática, contendo casos clínicos com os quais me cruzei na passagem pelos respetivos setores.

A Microbiologia sempre foi uma paixão, o trabalho manual envolvido e as decisões contantes que afetam o resultado obtido, bem como a capacidade das bactérias de se adaptarem constantemente ao meio que as envolve é algo que sempre me fascinou, tornando-se óbvia a escolha desta área para aprofundar.

No que diz respeito à Hematologia, embora não tenha sido um amor à primeira vista, tornou-se numa área que me foi conquistando aos poucos conforme fui aprendendo mais sobre a mesma.

Caracterização do local de estágio

O IPOCFG é uma unidade hospitalar integrada na rede de prestação de cuidados de saúde do Serviço Nacional de Saúde, especializada no diagnóstico e tratamento de doença oncológica.

Com o passar dos anos, o IPO de Coimbra tem vindo a crescer, com a modernização de equipamentos e espaços. Para além disso, o desenvolvimento levou a um aumento do volume de utentes e consequentemente do número de amostras.

Serviço de Patologia Clínica Laboratorial

Incluído no IPOCFG está o SPCL, dirigido pela Dr^a Ana Raquel Paiva, apoiada por uma equipa de cerca de 30 elementos, constituída por médicos, farmacêuticos, biólogos, bioquímicos, técnicos de diagnóstico e terapêutica (TDT), técnicos superiores de saúde (TSS), pessoal administrativo e auxiliares. O serviço está dividido em 5 setores, sendo eles: Microbiologia, Hematologia, Bioquímica, Imunologia e Virologia (este último com grande importância durante a pandemia de Covid-19, mas atualmente mais parado e com o qual não entrei em contacto, pelo que não será abordado).

O SPCL tem um número médio diário de 300 utentes, incluindo doentes de internamento e ambulatório. Possui uma sala de espera e uma área administrativa, responsável por receber os utentes bem como fazer o seu registo informático. A cada utente é atribuído um número que é associado a um código de barras único para cada setor e só depois de devidamente etiquetadas é que as amostras são processadas.

Para além disso, possui ainda uma sala para a colheita das amostras, a partir da qual as mesmas são depois distribuídas pelos respetivos setores. Note-se que as colheitas são efetuadas exclusivamente pelos TDTs do serviço.

Fase Pré-Analítica

A fase pré-analítica é uma etapa fundamental do processo analítico na medida que é a fase onde ocorrem a maioria dos erros associados aos exames laboratoriais.

Engloba diversos passos, desde a receção do doente, a correta etiquetagem dos tubos, o modo como a colheita das amostras biológicas é efetuada, o seu transporte, entre muitos outros.

Sendo que todos os possíveis erros nesta fase podem provocar alterações nos resultados analíticos, não posso deixar de ressaltar o estado da amostra como um dos que mais interfere.

Por este motivo é de extrema importância ter em consideração o estado da amostra, isto é, se há hemólise, turvação, lipémia, se a amostra está coagulada e se tem o volume correto de sangue-anticoagulante.

Uma amostra hemolisada ou lipémica pode levar ao aumento de determinados parâmetros analíticos e até mesmo interferir na leitura por absorvância; a interferência varia conforme o grau apresentado de hemólise/lipémia. Já a coagulação de uma amostra normalmente acontece quando se trata de uma colheita difícil ou devido à falta de homogeneização da mesma após a colheita, levando a falsos resultados nos parâmetros hematológicos.

Fase Analítica

A fase analítica diz respeito ao processamento das amostras, que ocorre apenas após serem efetuadas as manutenções necessárias a cada aparelho, bem como passados os respetivos controlos.

Fase Pós-Analítica

A fase pós-analítica diz respeito à validação dos resultados obtidos, após todos os parâmetros estarem determinados e disponíveis no sistema informático.

A validação dos resultados é feita pelos médicos especialistas em patologia clínica e pelos TSS e deve sempre ter em conta o histórico clínico e o estado atual do doente.

Controlo de Qualidade

Num laboratório de Análises Clínicas os controlos de qualidade são de extrema importância uma vez que conferem segurança e credibilidade aos resultados obtidos.

Todos os setores do SPCL do IPOCFG efetuam regularmente controlos de qualidade tanto internos como externos, que variam de setor para setor.

O controlo de qualidade interno avalia a reprodutibilidade da fase analítica/ precisão analítica, permitindo identificar e eliminar possíveis erros inerentes ao processo. Já o controlo de qualidade externo avalia a exatidão analítica através da realização de testes utilizando uma amostra desconhecida e cujo resultado é avaliado por um provedor externo. (1)

Microbiologia

O setor da Microbiologia está sob a coordenação do Dr. Rui Soares.

Neste setor são processados diversos tipos de amostras onde se pretende uma avaliação bacteriológica, micobacteriológica e/ou parasitológica, de acordo com o pedido do clínico, sendo um setor muito dependente de um extenso trabalho manual técnico.

O setor é composto por duas salas distintas, uma onde é realizado todo o processo desde a receção de amostras até à sua validação e outra onde apenas se encontram os microscópios para observação das lâminas coradas.

Pode ainda ser encontrado, interligado ao setor, uma área destinada ao estudo bioquímico da urina, pois apesar de não ser uma análise microbiológica facilita a interpretação das uroculturas.

Embora grande parte do trabalho seja manual, o setor dispõe de uma série de equipamentos automatizados que facilitam a rotina diária (Tabela 1).

Tabela 1: Lista dos principais equipamentos do Setor da Microbiologia no SPCL do IPOCFG e respetivas funções/especificidades.

Equipamento	Função e Especificações
Cobas u 411 da Roche® Diagnostics	Realização de Sumária de Urina
Vitek® 2 Compact da BioMérieux™	Identificação de microrganismos (testes ID) e realização de testes de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA)
Accelerate pheno da Accelerate Diagnostics	Identificação rápida de microrganismos e realização TSA, a partir de hemoculturas positivas.
BD Bactec™ 9050 Blood Culture System	Incubação de Hemoculturas e deteção do crescimento de microrganismos nas mesmas
GeneXpert® da Cepheid	Sistema automatizado para realização de testes de Biologia Molecular por PCR em tempo real
MicroScan autoSCAN-4 System da Beckman Coulter	Leitura de galerias que permitem identificar microrganismos e realizar o TSA.
Câmara de Fluxo laminar	Providencia uma área de trabalho estéril para a manipulação das amostras
Estufas	Local para incubação de meios com temperaturas e atmosferas adequadas (37°C; 30°C; 25°C)

Aerospray Gram	Aparelho automatizado para efetuar coloração de lâminas pela técnica de Gram de esfregaços e citoesfregaços por citocentrifugação
Aerospray Kinyoun	Aparelho automatizado para efetuar coloração de lâminas pela técnica de Kinyoun de esfregaços e citoesfregaços por citocentrifugação

Meios de Cultura

Existe uma diversidade enorme de meios de cultura, podendo ser sólidos ou líquidos e onde cada meio apresenta diferentes constituintes, desempenhando diferentes funções e especificações (tabela 2). Por tais razões, diferentes meios são utilizados para semear diferentes produtos.

*Tabela 2: Lista dos principais equipamentos do Setor da Microbiologia no SPCL do IPOCFG e respectivas funções/especificidades.
(Adaptado das Bulas constantes nos Meios)*

Meio	Classificação	Funções/especificidades
BACTEC Aerobic Plus/F	Garrafa de hemocultura, não seletivo	Permite o crescimento e recuperação de microrganismos aeróbios em hemoculturas.
BACTEC Anaerobic Plus/F	Garrafa de hemocultura, não seletivo	Permite o crescimento e recuperação de microrganismos anaeróbios em hemoculturas.
Caldo cérebro-coração (BHI)	Meio líquido, não seletivo	Utiliza-se como meio de enriquecimento.
Caldo de Carne (CC)	Meio Líquido, não seletivo	Utiliza-se como meio de enriquecimento.
Caldo Gram Negativo (GN)	Meio líquido, seletivo	Utiliza-se como meio de enriquecimento para amostras fecais. Favorece o crescimento de bactérias Gram negativo.
Caldo Selenito	Meio líquido, seletivo	Utiliza-se como meio de enriquecimento para amostras fecais.

Gelose chocolate + PolyViteX (PVX)	Meio sólido, não seletivo	Permite o crescimento de organismos fastidiosos como <i>Haemophilus</i> sp., <i>Neisseria</i> sp. e <i>Streptococcus pneumoniae</i> .
Gelose Columbia com colistina e ácido nalidíxico (CNA)	Meio sólido, seletivo e diferencial	Permite o isolamento e diferenciação de bactérias Gram-positivo. Permite a observação de halos de hemólise.
Gelose Columbia suplementada com 5% sangue de carneiro (COS)	Meio sólido, não seletivo	Possibilita o crescimento de Bactérias de Gram-positivo, Gram-negativo e leveduras. Permite a observação de halos de hemólise.
Gelose de Cistina, Lactose e Défice em Eletrólitos (CLED)	Meio sólido, não seletivo e diferencial	Permite o crescimento e quantificação de microrganismos de Gram-negativo, Gram-positivo e leveduras. Permite diferenciar microrganismos fermentadores da lactose dos não fermentadores.
Gelose de Desoxicolato-Lisina-Xilose (XLD)	Meio sólido, seletivo e diferencial	Utiliza-se para a cultura de amostras fecais. Inibe o crescimento de Gram positivo
Gelose Kektoen (HEKT)	Meio sólido, seletivo e diferencial	Utiliza-se para cultura de microrganismos entéricos Gram negativo em amostras fecais e isolamento de <i>Shigella</i> e <i>Salmonella</i> . Inibe crescimento de Gram positivo.
Gelose MacConkey (MCK)	Meio sólido, seletivo e diferencial	Permite o crescimento de Gram negativo e diferencia entre colónias

		fermentadoras e não fermentadoras da lactose.
Gelose Mueller-Hinton (MH)	Meio sólido, não seletivo	Utiliza-se para a realização de testes de sensibilidade aos antimicrobianos manual
Gelose Mueller-Hinton fastidious (MHF)	Meio sólido, não seletivo	Utiliza-se para a realização de testes de sensibilidade aos antimicrobianos manual de bactérias fastidiosas.
Gelose Sabouraud com Gentamicina e Cloranfenicol (SGC2)	Meio sólido, seletivo	Utiliza-se para a pesquisa de fungos (leveduriformes e filamentosos). Inibe o crescimento bacteriano.
Gelose Schaedler (SCS)	Meio sólido, não seletivo	Utiliza-se para sementeira de bactérias anaeróbias
Gelose Schaedler suplementada com canamicina e vancomicina (KV)	Meio sólido, não seletivo	Utiliza-se para sementeira de bactérias anaeróbias

Exame Macroscópico

O Exame Macroscópico consiste no registo do aspeto do produto assim que este chega ao laboratório em termos de cor, aspeto, consistência, presença de sangue, entre outras características.

É também muito importante fazer referência ao meio onde foi enviado/colhido o produto, ou seja, se é uma zaragatoa, uma seringa, um contentor em anaerobiose ou aerobiose, pois isso poderá influenciar o processamento do mesmo.

Exame Microscópico

O exame microscópico consiste na observação, ao microscópio ótico, dos esfregaços diretos do produto que são corados pela Técnica de Gram, de modo a permitir observar a morfologia das bactérias encontradas (cocos ou bacilos) e os seus agrupamentos, caso existam, para além

de diferenciar as mesmas entre Gram-positivo e Gram-negativo, ajudando a orientar a posterior identificação, segundo o esquema da figura 1.

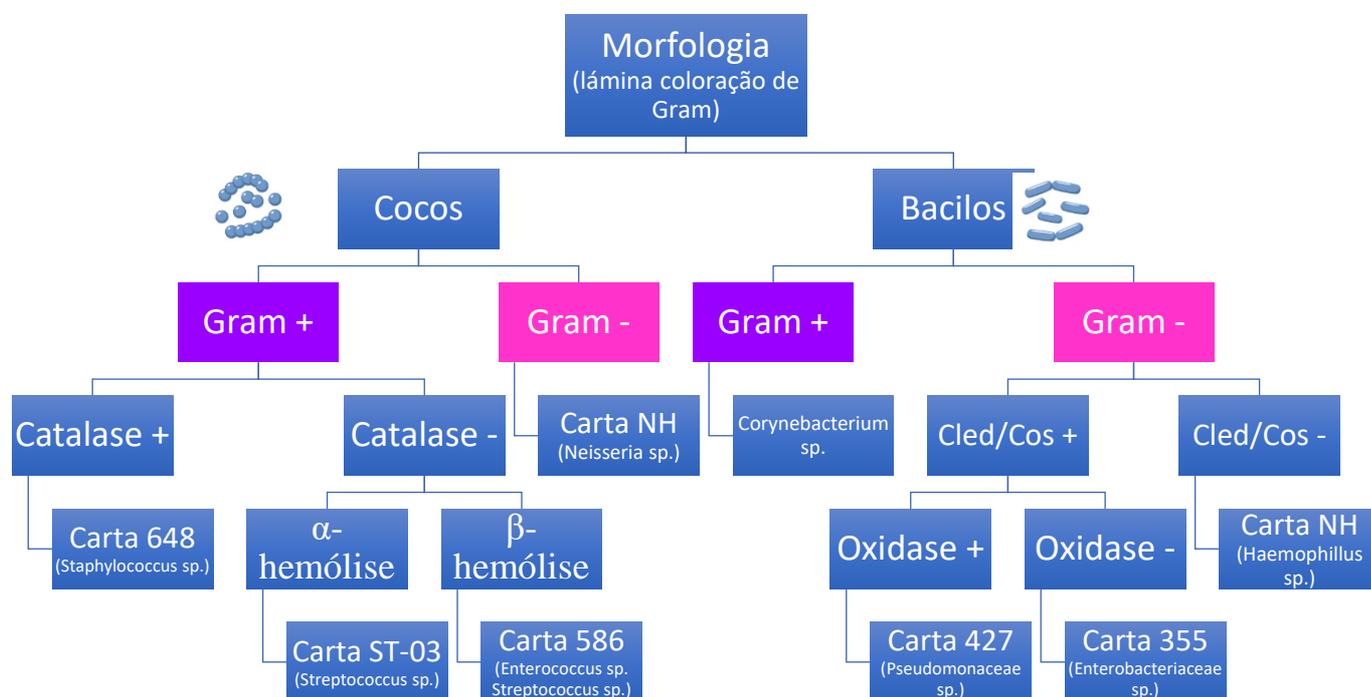


Figura 1: Esquema orientador da identificação de bactérias e realização de teste de suscetibilidade aos antibióticos utilizado no SPCL do IPOCFG (Fonte: SPC do IPOCFG)

O esfregaço, independentemente da coloração, corresponde a uma leve camada de produto microbiológico sobre uma lâmina de vidro, sendo este submetido a uma fixação à chama, e posteriormente, corado nos aparelhos automáticos de AeroSpray que permitem uma coloração rápida e automática, para observação ao microscópio.

Coloração de Gram

A coloração de Gram foi desenvolvida pelo patologista Dinamarquês Hans Christian Gram em 1884 e é ainda nos dias atuais a coloração mais utilizada em microbiologia. Esta é uma coloração diferencial, uma vez que permite diferenciar as bactérias em dois grupos distintos: as bactérias de Gram-positivo e as bactérias de Gram-negativo. (2,3)

A coloração de Gram baseia-se nas características físicas e químicas da parede celular dos microrganismos, principalmente na capacidade de reter o corante primário após a descoloração com álcool-acetona. (2,3)

As bactérias de Gram-positivo possuem uma camada externa e espessa de peptidoglicano, que mantém a coloração roxa do primeiro corante (violeta cristal), já as bactérias de Gram-negativo possuem uma camada de peptidoglicano muito mais fina, para além de uma membrana externa constituída por lipopolissacarídeos e fosfolípidos, que vai fazer com que sofram descoloração do primeiro corante, durante a etapa de descoloração com o álcool-acetona pois este dissolve a porção lipídica das membranas externas das bactérias de Gram-negativo e o complexo cristal violeta-iodo é removido, descolorando as células, permitindo que corem depois pelo segundo corante (fucsina básica), apresentando assim uma coloração rosa.(2,3)

Além da coloração das bactérias, a coloração de Gram também permite observar a forma da bactéria (cocos, bacilos, cocobacilos ou espiroquetas) e os seus agrupamentos (diplococos, tétradas, estafilococos, estreptococos, diplobacilos ou estreptobacilos).

Coloração de Kinyoun

Caso seja pedido pelo clínico a pesquisa de Micobactérias, embora o exame cultural não seja feito na Instituição, é feita uma observação ao microscópio do esfregaço efetuado diretamente do produto e corado pela técnica de Kinyoun, de modo a tentar identificar a presença de bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR) na amostra (figura 2).

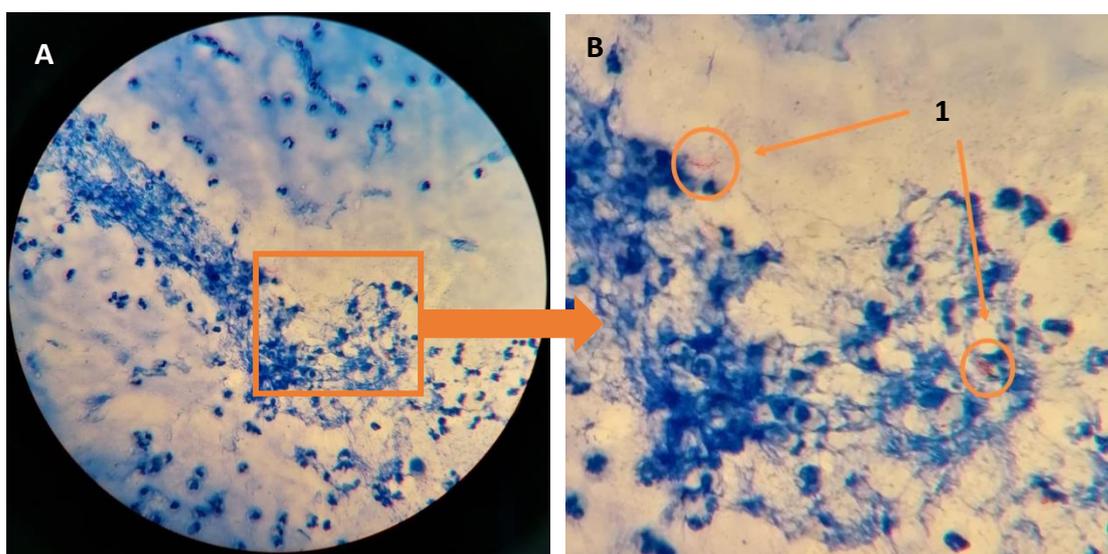


Figura 2: A – Esfregaço de expetoração corada pela técnica de Kinyoun e observada ao microscópio ótico na ampliação de 500x; B – Ampliação do esfregaço em A para observação de bacilos ácido-álcool resistentes. (1) (Fonte: SPCL do IPOCFG)

A coloração de Kinyoun é uma técnica de coloração de BAAR, que não são bem coradas pela técnica de Gram, como é o caso das bactérias dos géneros *Mycobacterium* e *Nocardia*.(4)

Estas bactérias possuem uma parede celular muito característica, constituída por uma camada de peptidoglicano ligada a arabino-galactano, que está por sua vez ligado a ácidos micólicos. É esta estrutura peculiar que impede a passagem do solvente (ácido-álcool) durante o processo de descoloração na técnica de Gram, retendo assim a coloração primária; daí a denominação de «ácido-álcool resistentes», pois resistem fortemente à descoloração.(5)

A coloração de Kinyoun, também conhecida como coloração de Ziehl Neelsen modificada, é uma técnica de coloração similar à coloração de Ziehl Neelsen, técnica usualmente utilizada para corar BAAR, mas ao contrário desta a coloração de Kinyoun não requer a fase de aquecimento, ou seja, é “realizada a frio”. (6)

Provas Realizadas:

- Exame Cultural Bacteriológico:

O exame bacteriológico, consiste na pesquisa, cultura, isolamento, identificação e TSA de bactérias (aeróbias e/ou anaeróbias) nos variados produtos, cujo processamento é explicado mais à frente no relatório.

Os meios de cultura utilizados diferem consoante o tipo de produto, o modo de envio da amostra (seringa, contentor, zaragatoa) e o estado/suspeita clínica.

- Exame Cultural Micológico:

O exame micológico por sua vez consiste na pesquisa da presença de fungos, leveduriformes e/ou filamentosos, nas variadas amostras (figura 3).

Para a pesquisa de fungos leveduriformes a amostra é inoculada no meio de SGC2, ficando a incubar na estufa de 37°C durante 48 horas, no entanto para a pesquisa de fungos filamentosos o mesmo meio de cultura incuba até 15 dias na estufa de 30°C. Para além disso, na pesquisa de fungos filamentosos, é sempre feita a inoculação em duplicado, para que uma placa seja o controlo da outra permitindo assim descartar algum contaminante ambiental se este apenas crescer numa das placas.

A utilização de parafilme em todas as geloses de SGC2 logo após a inoculação da primocultura também permite evitar contaminações.

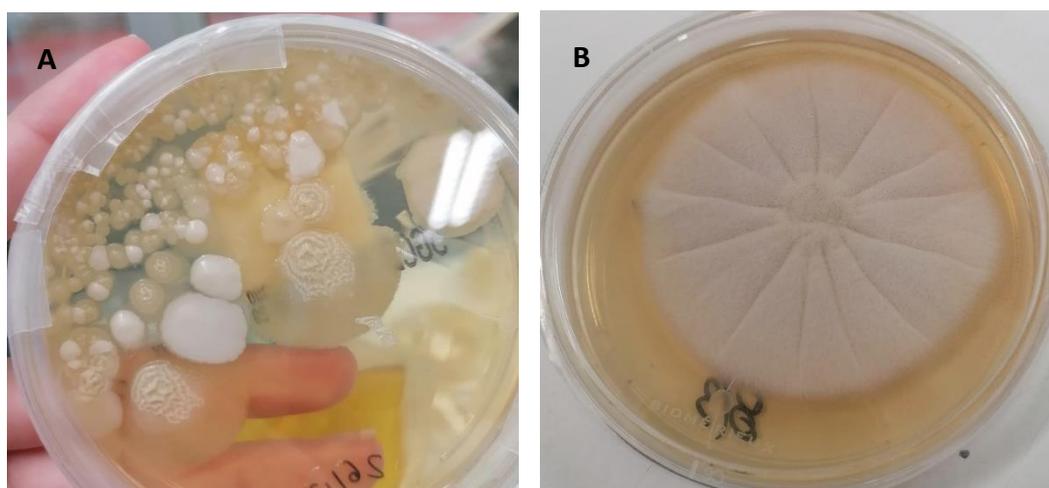


Figura 3: A – Meio de Sabouraud com crescimento de fungos leveduriformes; B – Meio de Sabouraud com crescimento de fungos filamentosos. (Fonte: SPCL do IPOCFG)

- Exame Parasitológico:

O exame parasitológico consiste na pesquisa de estruturas parasitárias como ovos, quistos e seres adultos. Este exame é normalmente solicitado em amostras de fezes, embora possa ser pedido noutra tipo de amostras, como por exemplo num exsudado vaginal ou uretral.

Para este tipo de pesquisa existem alguns testes rápidos imunocromatográficos dos microrganismos mais comuns, nomeadamente para a pesquisa de *Giardia* e *Cryptosporidium* nas fezes.

- Identificação de Microrganismos:

Depois de isoladas as culturas de interesse, normalmente procedemos à identificação no equipamento automatizado Vitek, utilizando para tal cartas de identificação, como descrito na tabela 3.

Tabela 3: Lista de cartas de identificação utilizadas para o equipamento Vitek, no SPCL do IPOCFG. (Fonte: SPCL do IPOCFG)

Carta	Especificação
GN	Bactérias de Gram-negativo
GP	Bactérias de Gram-positivo
NH	<i>Neisseria</i> spp. e <i>Haemophilus</i> spp.

ANC	Anaeróbios e bacilos Gram positivo
YST	Fungos leveduriformes

- Testes de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA):

○ TSA pode ser realizado de forma automatizada ou de forma manual.

TSA automatizado:

○ TSA automatizado pode ser feito em 2 equipamento distintos, o Vitek e o AutoSCAN-4; em ambos é necessário obter culturas puras do microrganismo em questão.

○ AutoSCAN-4 utiliza galerias e obtém o TSA por microdiluição.

○ Vitek utiliza cartas de TSA tendo em conta o tipo de microrganismo, como mostra a tabela 4.

Tabela 4: Lista de cartas dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos utilizadas para o equipamento Vitek, no SPCL do IPOCFG.

(Fonte: SPCL do IPOCFG)

Carta	Especificação
355	<i>Enterobacterales</i>
427	<i>Pseudomonaceas</i>
586	<i>Enterococcus</i> e <i>Streptococcus</i>
648	<i>Staphylococcus</i> spp.
XN-22	Microrganismos multirresistentes
ST-O3	<i>Streptococcus</i>

TSA manual:

○ TSA manual é utilizado para testar a sensibilidade aos antibióticos e identificar mecanismos de resistência de um determinado microrganismo.

Este tipo de TSA pode ser realizado por 2 métodos: o método de difusão em disco (método de Kirby-Bauer modificado) e o método de difusão em gradiente (E-test), que se podem observar na figura 4.

Para ambos é necessário efetuar uma suspensão bacteriana com turvação igual a 0.5 McFarland (ou 1.0 McFarland para anaeróbios), e em seguida inocular uma gelose de

Mueller-Hinton (ou Mueller-Hinton fastidious para anaeróbios) pela sementeira em toalha de 3 planos.

Só depois é colocado o disco de antibiótico, ou a tira de E-test, e incuba durante 24 horas na estufa a 37°C, depois das quais se lê o diâmetro do halo de inibição em milímetros, se disco, ou a concentração mínima inibitória (MIC), se E-test.

Depois de lidos, os valores têm de ser interpretados segundo as tabelas do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)*, de modo a ver os pontos de corte para cada microrganismo, determinado assim se este é sensível ou resistente ao antibiótico em questão. (7)

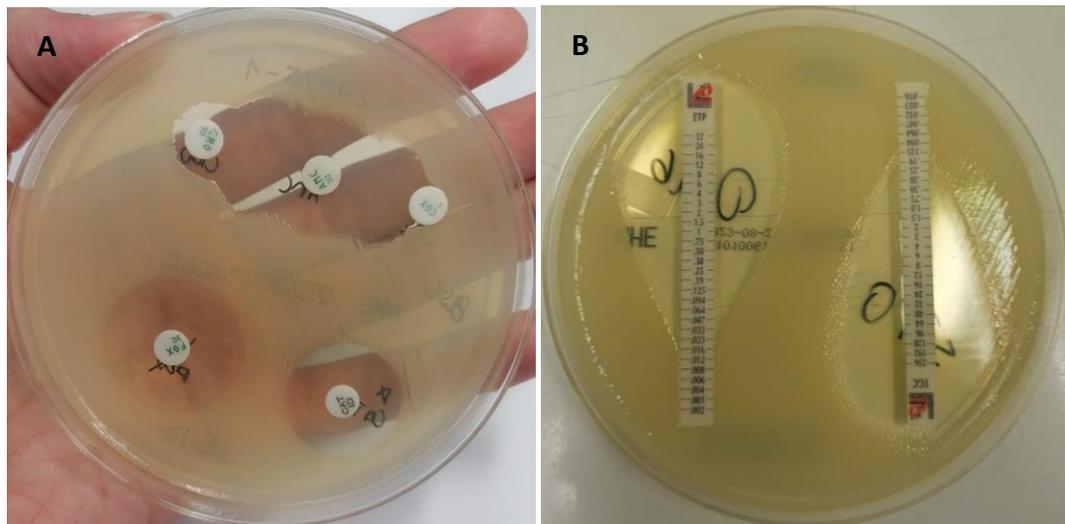


Figura 4: A – Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos manual para a pesquisa de perfis de suscetibilidade pelo método de difusão em discos de antibióticos, em gelose MH; B – Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos manual para testar a sensibilidade a antibióticos pelo método de difusão em gradiente (E-test), em gelose MH. (Fonte: SPCL do IPOCFG)

- **Biologia molecular:**

Neste setor são ainda efetuados alguns testes com recurso à tecnologia de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), com o objetivo de dar uma resposta mais rápida sobre a presença ou não de alguns microrganismos específicos.

Estes englobam por exemplo a pesquisa de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente/*Staphylococcus aureus* (MRSA/SA), *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), *Clostridioides difficile*, pesquisa de carbapenemasas, entre outros.

- **Provas Bioquímicas clássicas:**

As provas bioquímicas clássicas são uma ajuda essencial para uma rápida tomada de decisão na valorização ou não do microrganismo presente em cultura e até mesmo do tipo de carta de identificação a utilizar.

Prova da Oxidase: Esta prova permite identificar as bactérias que possuem atividade da enzima citocromo oxidase, envolvida no processo de redução do oxigénio no final da cadeia transportadora de eletrões. É uma prova muito utilizada no SPCL principalmente para bacilos de Gram negativo pois permite distinguir entre *Pseudomonaceas*, oxidase positiva, e *Enterobacteriales*, oxidase negativa. Um resultado positivo é caracterizado pelo aparecimento de uma coloração roxa na tira teste quando adicionada a bactéria oxidase positiva.

Prova da Catalase: Esta prova permite identificar as bactérias que possuem atividade da enzima catalase, responsável por decompor o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio. É uma prova simples e rápida, que permite distinguir bactérias do género *Staphylococcus*, catalase positiva, do género *Streptococcus*, catalase negativa. Um resultado positivo no teste é caracterizado pelo aparecimento de bolhas de ar quando se adiciona a bactéria catalase positiva ao peróxido de hidrogénio.

Prova da Coagulase: Esta prova permite identificar bactérias que possuem atividade da enzima coagulase, que quando na presença de plasma converte o fibrinogénio em fibrina formando um coágulo. É uma prova simples que permite distinguir bactérias da espécie *Staphylococcus aureus*, coagulase positiva, das demais espécies de *Staphylococcus*, coagulase negativa. Um resultado positivo no teste é caracterizado pela formação de um coágulo visível, após o período de incubação, quando se adiciona a bactéria coagulase positiva a um tubo de ensaio com plasma.

Teste da Sensibilidade à Optoquina: Esta prova permite identificar bactérias resistentes ao antibiótico optoquina. É uma prova simples que permite distinguir bactérias da espécie *Streptococcus pneumoniae*, sensível à optoquina, das demais espécies de *Streptococcus* alfa-hemolíticos, resistentes à optoquina. Para realizar este teste é necessário inocular uma gelose de COS pela sementeira em toalha com o inóculo da bactéria em questão e adicionar no centro da gelose um disco de optoquina que incuba a 37°C durante 24 horas, após as quais se lê o diâmetro do halo formado.

Amostras Biológicas

Uma vez que o tipo de amostras que chegam ao Setor da Microbiologia são tão variadas, em função da mesma o seu processamento sofre algumas alterações. No entanto, o objetivo final é sempre o de identificar o microrganismo presente causador de infeção e determinar o seu TSA, no menor tempo possível.

- Urina:

Sumária de Urina e sedimento urinário

A sumária de urina consiste num conjunto de parâmetros bioquímicos realizados por um equipamento automático, que auxiliam a avaliação das respetivas uroculturas. Estes parâmetros incluem por exemplo: pH, glicose, bilirrubina, urobilinogénio e nitritos.

Deve sempre ser registado o aspeto macroscópico da amostra (cor e turvação).

O sedimento urinário é obtido através da centrifugação de 10ml da amostra a 1500 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos.

Na observação do sedimento urinário ao microscópio ótico deve-se registar quantitativamente leucócitos, eritrócitos e células epiteliais. É também feito o registo de outros parâmetros, quando presentes, como por exemplo a bacteriúria e a presença de cristais.

Urocultura

A urocultura é o exame bacteriológico de urina que tem como objetivo isolar, quantificar e identificar os microrganismos presentes na mesma. Para este efeito a urina é semeada por uma técnica de sementeira quantitativa em 2 meios de cultura, CLED e COS, utilizando uma ansa calibrada de 1µl. As placas são incubadas em atmosfera de aerobiose a 37°C durante 24 horas. Caso seja pedido também pesquisa de fungos semeia-se em SGC2.

O meio de CLED, como é não seletivo, permite o crescimento de todos os microrganismos e é por isso o utilizado para realizar a quantificação da amostra.

São consideradas positivas as amostras que apresentem uma quantidade de colónias superior a 10^5 Unidades formadoras de colónias (UFC)/ml, ou seja, como a inoculação se efetuou com uma ansa de 1 μ l, devem ser vistas pelo menos 100 colónias.

Por vezes, se o crescimento for entre 10^4 a 10^5 UFC/ml, ou seja, se forem observadas entre 10 a 100 colónias, mas forem sugestivas de ser um microrganismo patogénico e existirem queixas clínicas sugestivas de infeção urinária são também consideradas como um resultado positivo, no entanto deixando a ressalva ao clínico da contagem observada.

Quando se verifica o crescimento de 3 ou mais microrganismos diferentes considera-se a amostra como polimicrobiana, sugerindo-se repetição de colheita, se clinicamente justificado.

- Sangue (Hemocultura):

Para as hemoculturas são utilizadas garrafas que contém um meio rico em tripticase de soja, resinas e quelantes de antibióticos, para além de um sensor químico que permite detetar os aumentos de CO_2 produzidos pelos microrganismos em crescimento, quando presentes, por um método de fluorescência. Esta deteção é efetuada pelo aparelho onde as garrafas de hemocultura ficam a incubar.

As hemoculturas, sejam de anaerobiose ou aerobiose, ficam no equipamento a incubar durante 7 dias, e quando há pedido de estudo micológico as hemoculturas de aerobiose ficam mais 7 dias adicionais, o que perfaz 14 dias, e as hemoculturas para pesquisa de micobactérias ficam no equipamento por 42 dias.

As hemoculturas podem dar positivo a qualquer altura, desde o momento que entram no equipamento, no entanto só podem ser dadas como negativas, ou seja sem crescimento microbiológico, ao final do tempo determinado, descrito acima.

Quando as hemoculturas são dadas pelo equipamento como positivas devem ser processadas o mais rapidamente possível. Na maioria das vezes o seu processamento inclui efetuar os esfregaços para a coloração de Gram e a sementeira em COS, para se confirmar a positividade da amostra e seguir para a identificação do microrganismo presente. Se for uma garrafa de anaerobiose a positivar, adicionalmente é semeado em meio SCS, sendo colocado em ambiente de anaerobiose.

Note-se que o sangue é à partida um produto estéril, no entanto pode haver contaminações das hemoculturas com microrganismos que fazem parte da microbiota da pele, como por exemplo *Staphylococcus* coagulase negativa. Por este motivo não é qualquer microrganismo presente na hemocultura que tem significado clínico, devendo-se sempre ter em consideração o conjunto das hemoculturas do doente.

- Pontas de cateter:

Este tipo de amostra deve ser enviado num contentor estéril, com um comprimento de cerca de 5 centímetros, sendo semeado em COS, com a especificidade de se rodar a ponta/porção distal do cateter pela gelose, utilizando-se a técnica semi-quantitativa de Maki. (8)

Depois disso, o cateter é inserido e deixado a incubar em meio BHI durante 24 horas, com o objetivo de recuperar algum microrganismo que possa estar presente, após as quais se repica para meio sólido (COS). É também efetuado um esfregaço, do meio líquido, para coloração de Gram de modo a ajudar a interpretar o crescimento em cultura.

- Fezes:

Este tipo de produto é, à partida, rico numa enorme diversidade de microrganismos da flora entérica pelo que o objetivo do processamento deste é um pouco diferente dos restantes, ou seja, não se pretende identificar todos os microrganismos presentes, mas sim pesquisar certos microrganismos conhecidos por causar patologia.

As fezes são por predefinição semeadas em dois meios de cultura, XLD e HEK, com o objetivo de procurar a presença de *Shigella* e *Salmonella*. Para além disso são também semeados meios líquidos de enriquecimento de amostras fecais, caldo GN e selenito.

Tanto *Shigella* como *Salmonella* não são fermentadoras da lactose e, portanto, quando presentes nos meios XLD e HEK formam colónias lactose negativas, de cor escura. Para além disso estes meios permitem observar a presença da formação de H₂S pela observação de colónias com o centro negro, produzidas por algumas bactérias como é o caso de *Salmonella*.

Sempre que se verifica o crescimento de colónias não fermentadoras da lactose, ou formadoras de H₂S, procedemos ao isolamento das mesmas, seguido da sua identificação e realização de TSA, no caso de ser valorizável.

Note-se que as culturas que não apresentem colónias com estas características, mas apresentem microrganismos colonizadores, não são dadas como culturas negativas, mas sim como negativas para a pesquisa de *Shigella* e *Salmonella*.

Quando pedido pelo clínico podem ser efetuados testes adicionais para pesquisa de diferentes microrganismos específicos:

- ✚ Teste imunocromatográfico para a pesquisa de *Campylobacter*, efetuado diretamente da amostra.
- ✚ Teste imunocromatográfico para a pesquisa de *C. difficile*, efetuado diretamente da amostra (fezes diarreicas).
- ✚ Teste de Biologia molecular por PCR em tempo real para pesquisa de *Enterobacteriales* produtoras de carbapenemases (zaragatoa retal)
- ✚ Teste imunocromatográfico para a pesquisa de *Giardia* e *Cryptosporidium*, efetuado diretamente da amostra, realizado se pedido exame parasitológico.

É ainda, por vezes, efetuado o pedido de pesquisa de parasitas nas fezes, realizado pelo método de Baillenger (princípio de sedimentação). É um método que permite a pesquisa de ovos, quistos e seres adultos nas fezes após centrifugação.

Existe ainda um outro teste, que por vezes pode ser pedido, quando o clínico não tem nenhuma suspeita específica ou pretende excluir opções, que é um teste multiplex das fezes, que é um teste de biologia molecular que permite detetar vários parasitas, vírus e bactérias que frequentemente causam infeção gastrointestinal (mais grave ou em imunocomprometidos). Este teste não é realizado no IPOCFG, tendo a necessidade de ser enviado ao Centro Hospitalar Universitário de Coimbra (CHUC).

- Secreções respiratórias:

Dentro das secreções respiratórias estão englobados vários produtos, alguns deles com especificações que afetam o seu processamento. As amostras mais comuns são as

expetorações, no entanto fazem também parte deste tipo de amostras os aspirados brônquicos e os lavados bronco-alveolares (LBA).

Se possível, as expetorações, devem ser a primeira da manhã e devem também ser verdadeiras expetorações, pelo que se rejeitam amostras de saliva.

Uma das formas de verificar se a amostra é uma verdadeira expetoração é pelo exame microscópico do esfregaço, pela quantificação de células epiteliais e de leucócitos presentes, na coloração de Gram, e a sua avaliação pelos critérios de Murray-Washington (tabela 5). São consideradas verdadeiras expetorações amostras classificadas nos grupos 4 e 5.

Tabela 5: Critérios de Murray-Washington para a avaliação da qualidade das amostras de expetoração. (9)

Classificação	Células Epiteliais (100x)	Leucócitos (100x)
Grupo 1	25	10
Grupo 2	25	10 – 25
Grupo 3	25	25
Grupo 4	10 – 25	25
Grupo 5	<10	25

Uma outra especificidade das expetorações é também o facto de que devido a ser um produto muito denso os esfregaços para coloração, seja Gram ou Kinyoun, são feitos por esmagamento.

A maioria das amostras do trato respiratório são semeadas em quatro meios diferentes, COS, MCK, PVX e SGC2, pela técnica de sementeira por esgotamento do produto à superfície do meio sólido, uma técnica qualitativa.

No caso do LBA é realizada uma sementeira quantitativa com uma ansa de 10µL.

- Exsudados purulentos (superficiais e profundos):

Este tipo de amostra consiste essencialmente em pus obtidos em exsudados de feridas, normalmente colhidos em zaragatoa, se superficiais. No caso de se tratar de lesões mais profundas a colheita é normalmente efetuada por punção e/ou aspiração, sendo nestes casos enviada em seringa capsulada ou em contentor estéril.

Este tipo de amostras é semeado pela técnica de esgotamento do produto em quatro meios diferentes, COS, MCK, PVX e SGC2. Caso a amostra seja colhida e transportada em condições de anaerobiose (seringa capsulada ou frasco Portagerme) vai ser inoculada também num meio líquido de enriquecimento, o caldo de carne, bem como semeada em SCS e KV, colocados em atmosfera de anaerobiose.

A atmosfera de anaerobiose é conseguida devido à colocação das respetivas geloses num saco com um gerador, que através do sistema GENbag da BioMérieux, permite obter a atmosfera pretendida.

O meio líquido normalmente incuba durante 48 horas, no entanto se estiverem turvos são repicados às 24 horas para COS em aerobiose e SCS e KV, em anaerobiose. É também efetuado o esfregaço do meio líquido para a coloração de Gram, de modo a ajudar a interpretar o crescimento das respetivas geloses.

- Líquidos serosos:

Os líquidos serosos são aqueles situados entre duas membranas que o delimitam e que têm como função lubrificar as mesmas, como é o caso do líquido pleural e do líquido peritoneal, entre outros.

Este tipo de amostra é semeado em três meios diferentes, COS, MCK e PVX, pela técnica qualitativa de esgotamento do produto à superfície do meio sólido, e ainda em dois meios em atmosfera de anaerobiose, SCS e KV.

Para além disso é também semeado no meio líquido de enriquecimento de CC que incuba 24 a 48 horas a 37°C, seguido de repicagem para meios sólidos, COS em aerobiose e SCS em anaerobiose. É efetuada um esfregaço para a coloração de Gram, do meio líquido, de modo a ajudar a interpretar o crescimento das culturas.

Relembrando que qualquer amostra independentemente do produto de origem, quando é considerada positiva, ou seja, se verifica o crescimento de colónias de microrganismos sugestivos de ter interesse clínico e de serem a causa da infeção, segue o processo de identificação do(s) microrganismo(s) presente(s) e o respetivo TSA, anteriormente explicados. Este é normalmente realizado no equipamento automatizado Vitek, no entanto por vezes pode

ser necessário realizar o TSA manual, testar alguns antibióticos adicionais e/ou identificar/confirmar alguma resistência aos antimicrobianos.

Casos Clínicos

- **Caso I:**

Doente do sexo masculino, 83 anos, seguido no IPOCFG por carcinoma espinocelular do esófago (cervical e torácico) metastizado, um diagnóstico limitante de vida. O doente deu entrada no serviço de urgência do CHUC com queixas respiratórias, sendo posteriormente encaminhado para o internamento no IPOCFG, no serviço de cuidados paliativos.

Apresentava febre, dificuldade respiratória, expectoração purulenta e a auscultação pulmonar sugestiva de infecção respiratória, pelo que o médico pediu o exame bacteriológico da expectoração.

Na 1ª e 2ª amostras de expectoração que chegaram ao SPCL, foram efetuados esfregaços do produto, corados pela técnica de Gram, onde se verificou que se tratavam de verdadeiras expectorações, uma vez que se observaram muitos leucócitos polimorfonucleares (PMN) e poucas células epiteliais. Para além disso, observou-se ainda na coloração de Gram do produto microbiota abundante, com frequentes cocos de Gram-positivo e alguns bacilos de Gram-negativo (figura 5).

Note-se que o envio de duas amostras em dias consecutivos, como aconteceu neste caso, leva a que uma amostra valide a outra, certificando-se de que não se trata de contaminações.

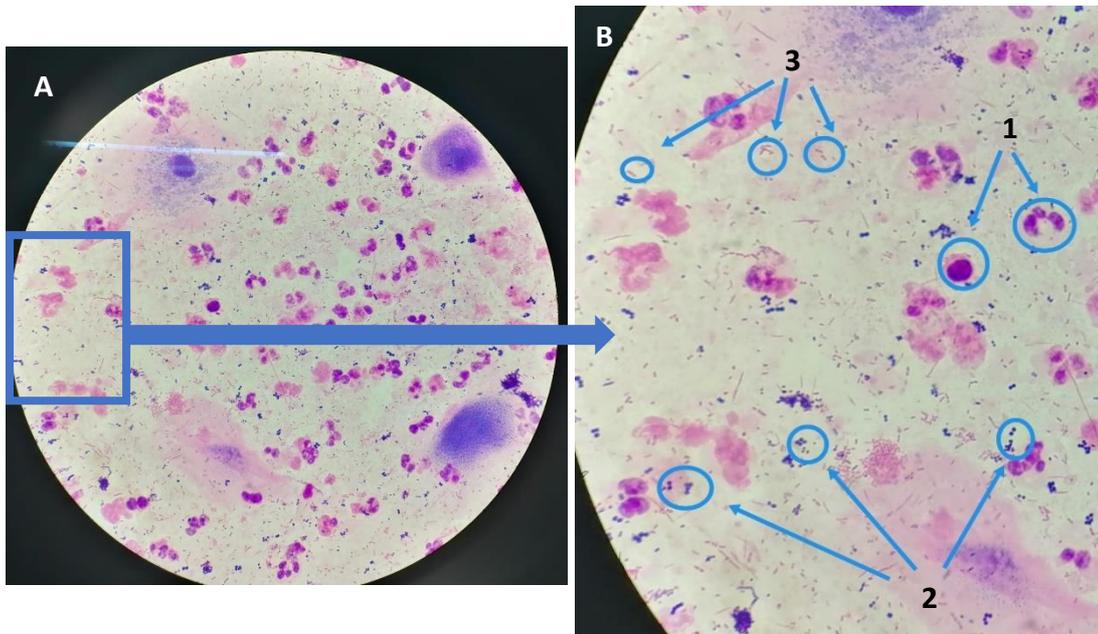


Figura 5: A – Observação do esfregaço da expetoração corado pela coloração de Gram ao microscópico ótico numa ampliação de 500x; B – Ampliação do esfregaço em A para observação de leucócitos polimorfonucleares (1), cocos de Gram-positivo (2) e bacilos de Gram-negativo (3). (Fonte: SPCL do IPOCFG)

Nos meios de cultura, onde foi semeado o produto, verificamos o crescimento de dois tipos diferentes de colónias, o que vai de encontro ao observado na coloração de Gram. Procedemos em seguida ao isolamento dos diferentes tipos de colónias de modo a tentar obter colónias puras para se poder efetuar as identificações dos microrganismos presentes e os respetivos TSA.

Assim que se obteve os isolamentos de colónias puras procedemos à identificação do microrganismo, utilizando para isso as cartas de identificação (GP ou GN) no equipamento Vitek, onde se realizam também as cartas para efetuar os respetivos TSA, conforme o esquema da figura 1.

Os resultados obtidos nas identificações foram, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (figura 6).

No que diz respeito ao TSA apresentavam ambos poucas resistências. *S. aureus* era sensível à meticilina (MSSA) e *P. aeruginosa* não apresentava nenhuma resistência, apenas era sensível em exposição aumentada a alguns antibióticos (tabela 6).

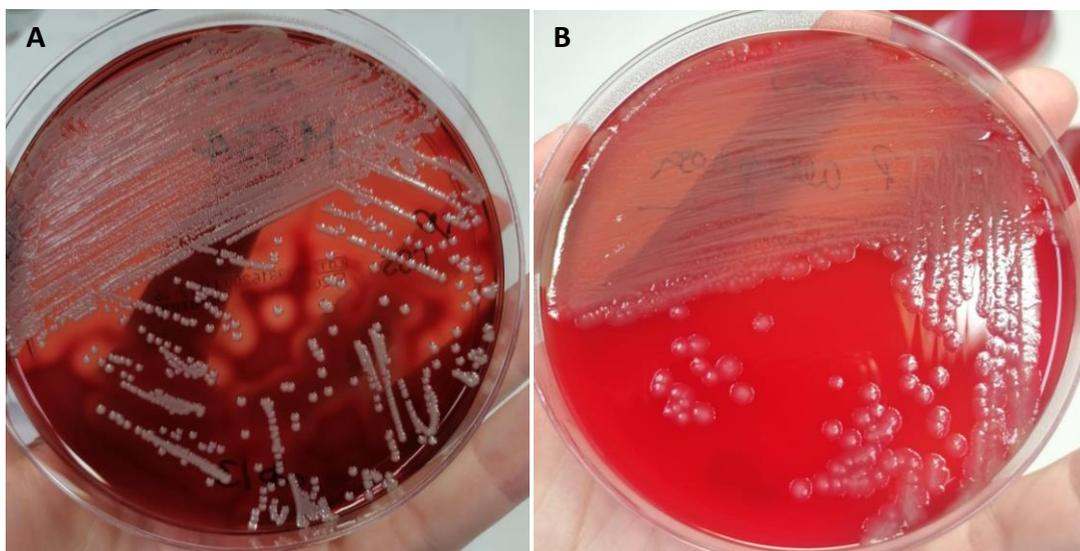


Figura 6: A – Colônias puras de *S. aureus* em cultura no meio de COS; B – Colônias puras de *P. aeruginosa* em cultura no meio de COS (Fonte: SPCL do IPOCFG)

Tabela 6: Antibiograma obtido pelas cartas de TSA a partir das colônias isoladas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. (Fonte: SPCL do IPOCFG)

Antibiótico	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Amoxicilina	Sensível	
Amoxicilina/Ácido Clavulânico	Sensível	
Ciprofloxacina	Intermédio	Intermédio
Levofloxacina	Intermédio	Intermédio
Piperacilina/Tazobactam	Sensível	Intermédio
Trimetropim/Sulfametoxazol	Sensível	
Vancomicina	Sensível	

Após os resultados obtidos anteriormente o clínico alterou a terapêutica que tinha administrado empiricamente (Amoxicilina/Ácido clavulânico) para Piperacilina/Tazobactam em doses aumentadas, de modo a que a terapêutica cobrisse ambos os microrganismos isolados, que provocaram a infecção.

Apesar da melhoria dos sintomas, o doente manteve a expectoração purulenta. Ao sexto dia de antibioterapia, voltou a ter queixas respiratórias, febre e continuava com

expetoração purulenta bem como uma auscultação sugestiva de infeção respiratória, pelo que o médico pediu um novo exame bacteriológico de expetoração e prolongou a antibioterapia de 7 para 10 dias.

Na nova amostra de expetoração que chegou ao SPCL, foi efetuado um esfregaço corado pelo método de Gram, onde se observou ao microscópio ótico, frequentes leucócitos PMN e microbiota abundante com frequentes bacilos de Gram-negativo.

Nos meios de cultura sólidos verificamos o crescimento de colónias com características macroscópicas sugestivas de *P. aeruginosa* (identificação presuntiva), com brilho metálico, no entanto não sendo isto suficiente para uma identificação procedemos ao isolamento de colónias puras e a identificação das mesmas pela carta para bactérias Gram negativo (GN) no equipamento Vitek, bem como à carta de TSA para *Pseudomonaceas*.

Tal como era esperado, o resultado da identificação foi *P. aeruginosa* (figura 7). O TSA demonstrou que a bactéria desenvolveu resistência a alguns antibióticos, nomeadamente à Piperacilina/Tazobactam que era a terapêutica instituída, justificando o facto de os sintomas de infeção respiratória como a febre e a expetoração purulenta terem agravado (tabela 7).



Figura 7: Colónias puras de *P. aeruginosa* em cultura no meio COS (Fonte: SPCL do IPOCFG)

Tabela 7: Antibiograma obtido pelas cartas de TSA a partir das colónias isoladas de *P. aeruginosa*. (Fonte: SPCL do IPOCFG)

Antibiótico	<i>P. aeruginosa</i>
Ceftazidima	Resistente
Ciprofloxacina	Intermédio
Imipenem	Intermédio

Levofloxacina	Intermédio
Meropenem	Sensível
Piperacilina/tazobactam	Resistente

Apesar das resistências adquiridas por *P. aeruginosa*, este microrganismo ainda tinha disponíveis opções terapêuticas, como a levofloxacina e ciprofloxacina (em doses de exposição aumentada) e o meropenem. No entanto, o doente acabou por falecer.

- **Caso 2:**

Doente do sexo feminino, 81 anos, seguida no IPOCFG por Linfoma T cutâneo na mão direita, com lesão ulcerada e friável.

A doente teve há cerca de dois meses um AVC isquémico, que levou a internamento hospitalar nos CHUC, durante o qual desenvolveu uma infeção do trato urinário (ITU) que foi tratada com recurso a ceftriaxone e meropenem.

Quando foi observada na consulta de cuidados paliativos no IPOCFG para tratamento paliativo da sintomatologia associada ao seu diagnóstico, referiu ter diarreia e não estar a utilizar no momento nenhum laxante, pelo que o médico pediu uma coprocultura para avaliar a causa da diarreia.

No exame bacteriológico das fezes, nos meios sólidos de HEK e XLD, não houve crescimento de nenhuma colónia lactase negativa do tipo *Shigella* e *Salmonella*,

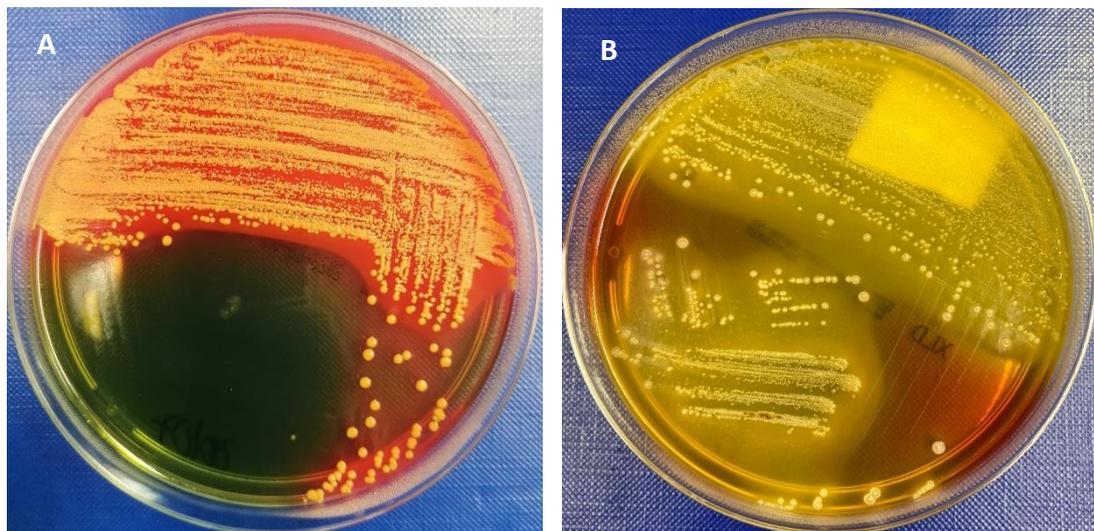


Figura 8: A – Observação de várias colónias lactase positiva no meio de cultura HEK; B – Observação de várias colónias lactase positiva no meio de cultura XLD (Fonte: SPCL do IPOCFG)

criaram apenas colónias lactase positiva que fazem parte da microbiota local (figura 8).

Para além disso, ainda dentro do exame bacteriológico, foi efetuado um teste rápido imunocromatográfico diretamente da amostra para a pesquisa de *Campylobacter*, cujo resultado foi negativo.

No que diz respeito ao exame parasitológico, foi efetuado um exame após concentração para pesquisa de ovos, quistos ou seres adultos nas fezes, e ainda um teste rápido imunocromatográfico diretamente da amostra, para pesquisa do antígeno de *Giardia lamblia* e do antígeno de *Cryptosporidium*. São pesquisados à partida estes dois parasitas pois são causas frequentes de infeção gastrointestinal em imunodeprimidos.

Não foram observados, ovos, quistos ou seres adultos no exame após concentração e o teste imunocromatográfico para *Giardia* e *Cryptosporidium* também foi negativo.

Quando pedido pelo clínico por forte suspeita ou para exclusão de causas de infeção gastrointestinal, é efetuado um teste rápido imunocromatográfico para a pesquisa de *C. difficile*, que neste caso deu positivo (figura 9). Este teste deteta simultaneamente a glutamato desidrogenase (GDH) e as toxinas A e B. A GDH é expressa por todas as estirpes de *C. difficile*, indicando a presença da mesma, enquanto que as toxinas são expressas apenas pelas estirpes toxinogénicas.

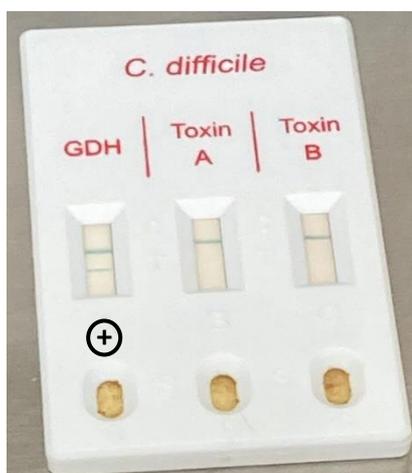


Figura 9: Teste imunocromatográfico positivo para a pesquisa de *C. difficile* (Fonte: SPCL do IPOCFG)

Este teste pode ter algumas interferências, como a presença de sangue oculto nas fezes, pelo que segundo as normas da direção geral de saúde (DGS) quando dá positivo o resultado tem de ser confirmado por um método de biologia molecular.

O teste de RT-PCR realizado no equipamento geneXpert deu positivo para *C. difficile* toxigénico, positivo para a presença da toxina binária e negativo para o serotipo 027 (um serotipo mais agressivo), confirmando assim a infeção por *C. difficile*.

Os resultados obtidos levam assim a que o clínico faça o diagnóstico de colite pseudomembranosa. Foi instituída terapêutica, vancomicina, apresentando sucesso terapêutico.

Note-se que os sintomas (fezes diarreicas) em conjunto com os fatores de risco, como hospitalização prolongada e o uso recente de certos antibióticos, levam à suspeita clínica de infeção por *C. difficile*, no entanto os resultados laboratoriais positivos (teste imunocromatográfico e o teste de biologia molecular positivos) é que confirmam o diagnóstico.

Hematologia

A Hematologia consiste no estudo das células sanguíneas e dos órgãos que intervêm na sua formação. No SPCL do IPOC é também avaliado neste setor a homeostase.

O estudo do sangue é de extrema importância de modo geral pois permite aferir o estado de saúde do doente. No IPOC esta relevância torna-se ainda maior na medida que os tratamentos realizados pelos doentes oncológicos frequentemente afetam as células sanguíneas e/ou as suas funções.

O setor de Hematologia está sobre a coordenação da Dr^a Joana Diamantino, com o apoio do Dr. Jorge Reis e o Dr. Nuno Oliveira, onde são determinados vários parâmetros hematológicos.

Este setor está bastante automatizado, utilizando para a rotina diária um conjunto de equipamentos automáticos que auxiliam e facilitam a rapidez na obtenção de resultados (tabela 8).

Tabela 8: Lista dos principais equipamentos do Setor da Hematologia no SPCL do IPOCFG e respetivas funções/especificidades.

Equipamento	Função e Especificações
Aerospray® Hematology Slide Stainer Cytocentrifuge	Equipamento automático para a coloração de esfregaços de sangue periférico e aspirados de medula óssea
DxH 900 Hematology Analyzer (Beckman Coulter)	Equipamento automático para a realização do Hemograma, com contagem diferencial de leucócitos
Bcl da Alifax® SPA	Equipamento automático para o estudo da velocidade de sedimentação globular
ACL TOP® 350 CTS Instrumentation Laboratory (Werfen)	Equipamento automático para o estudo da hemóstase
GeneXpert® Cepheid	Equipamento automático para a realização de PCR em tempo real (pesquisa do gene BCR-ABL e do Fator V Leiden)
BD FACSCanto™ II Flow Cytometry Systems	Equipamento automático para a realização de estudos de imunofenotipagem por citometria de fluxo

As amostras analisadas neste setor são essencialmente sangue total e aspirados de medula óssea, sendo o primeiro o mais frequente.

Amostras de Sangue Total:

O sangue é colhido num tubo próprio contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), que é essencial para impedir a ativação da cascata de coagulação pois este funciona como um quelante de cálcio, ou seja, o EDTA liga-se aos iões de cálcio da amostra formando um sal insolúvel e como o cálcio é necessário para ativar a coagulação esta não ocorre.(10,11)

A técnica de vácuo utilizada para a colheita da amostra tem a vantagem da tampa permitir o acesso à amostra sem necessidade de remover a mesma.

Utiliza-se o EDTA como anticoagulante neste setor para a realização de hemogramas, quantificação da velocidade de sedimentação e esfregaços de sangue periférico, pois este preserva a estrutura e morfologia das células sanguíneas e apresenta um volume vestigial, logo não vai diluir a amostra.(12)

Quando se pretende realizar testes para o estudo da hemóstase utiliza-se um tubo com o anticoagulante citrato de sódio, onde a proporção sangue/anticoagulante é muito importante para não produzir falsos aumentos dos tempos de coagulação. Neste caso o cálcio liga-se de forma covalente ao citrato de sódio ficando indisponível para ser utilizado na cascata de coagulação, no entanto essa associação é facilmente reversível, através da adição de iões de cálcio, e é por esse motivo o anticoagulante de excelência para os testes de coagulação.(10)

Algumas amostras são colhidas a quente e devem ser processadas de imediato. Estas colheitas a quente servem para impedir a ação de aglutininas a frio, ou seja, anti-anticorpos que com a diminuição da temperatura ficam ativos e promovem a aglutinação dos eritrócitos.

Todas as amostras devem ser homogeneizadas cerca de 5 minutos, no agitador, antes de serem processadas. Todas as amostras que chegam ao Setor da Hematologia seguem um percurso que passa inicialmente pelo equipamento dos Hemogramas e em seguida pelo equipamento da Velocidade de Sedimentação (VS), e as amostras para estudo da hemóstase seguem para o equipamento responsável pela realização das provas de coagulação.

Provas realizadas

- Hemograma:

Os resultados do hemograma são constituídos por valores numéricos (que o equipamento doseia/determina) e que devem ser comparados com os valores de referência (valores esperados ou normais). Os valores de referência podem variar de acordo com o sexo e com a idade.

No hemograma estão incluídos os seguintes parâmetros (13):

1. Contagem eritrocitária (RBC):

O RBC consiste na quantificação do número dos eritrócitos por unidade de volume de sangue, medidos diretamente pelo aparelho. É expresso como $n \times 10^6$ células/ μL .

2. Concentração de Hemoglobina (HGB):

A hemoglobina é uma proteína constituinte dos glóbulos vermelhos que tem como principal função transportar oxigênio. (14)

Este parâmetro consiste na quantidade de hemoglobina por unidade de volume e é expresso em g/dL. Este parâmetro é muito importante para o diagnóstico e seguimento clínico de anemias (tabela 9).

Tabela 9: Quadro resumo das alterações na concentração de hemoglobina e possível patologia associada a cada alteração

Parâmetro	Alteração	Possível Causa
HGB	 Anemia	Produção deficiente, perdas/hemólise
	 Eritrocitose	Eritropoiese aumentada, Policitemia Vera

3. Volume Corpuscular Médio (VCM):

O VCM corresponde ao Volume médio dos eritrócitos, ou seja, avalia o tamanho dos eritrócitos. Este parâmetro é expresso em fL e é utilizado para a classificação do tipo de anemia (tabela 10).

Tabela 10: Quadro resumo das alterações no volume corpuscular médio e possível patologia associada a cada alteração.

Parâmetro	Alteração	Possível Patologia
VCM	Microcitose	Anemia ferropriva, Hemoglobinopatias (Talassemia), Anemia sideroblástica
	Normocitose	Anemia de doenças crónicas, anemia hemolítica
	Macrocitose	Hepatopatia, alcoolismo, Anemia megaloblástica (deficiência em ácido fólico/Vitamina B ₁₂), Anemia perniciosa; Quimioterapia

4. Hematócrito (HTC):

O HTC corresponde ao volume ocupado pelos eritrócitos num determinado volume de sangue. O seu valor é expresso em percentagem e a fórmula utilizada para o determinar é:

$$\text{HTC (\%)} = (\text{RBC} \times \text{VCM}) / 10$$

5. Hemoglobina Corpuscular Média (HCM):

O HCM corresponde ao conteúdo médio de hemoglobina presente em cada eritrócito. Este parâmetro é expresso em pg, e determinado com base na fórmula:

$$\text{HCM (pg)} = (\text{HGB/RBC}) \times 10$$

Este parâmetro é utilizado para a classificação do tipo de anemia (tabela 11).

Tabela 11: Quadro resumo das alterações na hemoglobina corpuscular média e possível patologia associada a cada alteração.

Parâmetro	Alteração	Possível Patologia
HCM	Hipocromia	Défice de ferro, Hemoglobinopatias (ex. Talassemia)
	Normocromia	Anemia de doenças crónicas, Anemia hemolítica

	Hipercromia	Esferocitose hereditária
--	-------------	--------------------------

6. Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM):

O CHCM é uma estimativa da concentração média de hemoglobina presente nos eritrócitos, que reflete a intensidade da coloração dos eritrócitos. Este parâmetro é expresso em g/dL e determinado com base na fórmula:

$$\text{CHCM (g/dL)} = (\text{HGB/HTC}) \times 100$$

7. Índice de dispersão do volume celular (RDW):

Este parâmetro consiste na avaliação da anisocitose, ou seja, avalia a variação de tamanho entre os eritrócitos. O seu valor é expresso em percentagem e consiste num coeficiente de variação.

8. Contagem Leucocitária (WBC) e fórmula diferencial:

A contagem leucocitária representa o número de leucócitos por volume de sangue. A fórmula diferencial/leucograma fornece as proporções dos diferentes tipos celulares que constituem o número total de leucócitos: neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos. O equipamento expressa estes parâmetros em % e em valor absoluto.

Note-se que sempre que seja necessário pode-se realizar a fórmula diferencial na observação do esfregaço de sangue ao microscópio ótico.

As alterações quantitativas mais comuns da série branca, bem como as principais causas associadas, encontram-se explicadas na tabela 12.

Tabela 12: Quadro resumo das alterações quantitativas dos leucócitos e possível patologia associada a cada alteração.

Parâmetro	Alteração	Causas possíveis
Neutrófilos	Neutrofilia	Infeção Bacteriana, Síndromes mieloproliferativas crónicas
	Neutropenia	Induzida por fármacos

Linfócitos	Linfocitose	Leucemia Linfocítica Crónica (LLC), infecção viral (ex.: Mononucleose)
	Linfopenia	Imunodeficiência
Monócitos	Monocitose	Infeção bacteriana, Leucemia Mielomonocítica crónica (LMMC)
Eosinófilos	Eosinofilia	Reação alérgica, intoxicação por metais pesados (ex.: chumbo)
Basófilos	Basofilia	Leucemia Mieloide Crónica (LMC)

9. Contagem Plaquetar (PLT):

De forma semelhante ao RBC e WBC, a contagem plaquetar é realizada automaticamente pelo equipamento e representa o número de plaquetas por volume de sangue. Este parâmetro é expresso em μL .

10. Índice de dispersão do volume plaquetar (PDW):

O PDW é um índice que avalia o desvio padrão do volume plaquetar permitindo suspeitar de anisocitose plaquetar.

Apesar de útil é sempre necessário verificar a presença de agregados plaquetares e de plaquetas gigantes, através da observação do esfregaço sanguíneo.

11. Contagem de Reticulócitos (RTC):

Os reticulócitos são células precursoras dos eritrócitos, que já se encontram numa fase final da sua diferenciação, no entanto estas células ainda não tem a capacidade de efetuar o transporte de oxigénio na corrente sanguínea. (15)

Uma característica dos reticulócitos é apresentarem restos de RNA no seu citoplasma que podem ser observados com recurso a corantes supra-vitais. (16)

O RTC traduz o número de reticulócitos por cada 100 eritrócitos presentes na amostra e é expresso em %.

Este parâmetro pode ser determinado automaticamente pelo equipamento ou de forma manual, através da sua quantificação no esfregaço de sangue.

- Velocidade de Sedimentação (VS):

A VS é um parâmetro hematológico, que contribui para o diagnóstico e seguimento dos processos infecciosos/inflamatórios.

A VS pode-se encontrar alterada em inúmeras patologias, pelo que é um parâmetro não específico.

O método utilizado para a determinação da VS consiste na determinação da velocidade de separação dos eritrócitos do plasma. Os eritrócitos tendem a depositar-se e o plasma a deslocar-se para cima.

A sedimentação dos eritrócitos deve-se ao facto de estes serem mais pesados comparativamente aos outros elementos do sangue, bem como à sua propriedade de formarem agregados.

Os eritrócitos apresentam carga eletronegativa, fazendo com que se afastem uns dos outros. Os componentes do plasma como o fibrinogénio e as globulinas (proteínas de fase aguda) apresentam carga positiva. Quando há um aumento destas proteínas plasmáticas, há uma neutralização das cargas elétricas da membrana dos eritrócitos, fazendo com que o tempo que estes demoram a sedimentar/agregar aumente.(13)

- Esfregaço de Sangue Periférico:

Por vezes, seja por pedido do clínico ou por opção dos especialistas, é necessário efetuar lâminas do esfregaço do sangue periférico para coloração e observação dos elementos constituintes do mesmo.

A coloração efetuada no SPCL é a coloração de Wright, utilizando-se um equipamento automático de aerospray. A coloração de Wright é uma técnica de coloração histológica, baseada no princípio de coloração estabelecida por

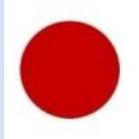
Romanowsky, que utiliza uma combinação de corante ácido e corante básico, facilitando a diferenciação dos tipos de células sanguíneas. (17)

O esfregaço de sangue permite observar a morfologia de todos os elementos presentes, bem como efetuar contagens permitindo não só confirmar os resultados

obtidos pelo equipamento do Hemograma, mas também dar informações relevantes acerca da morfologia das células.

As alterações morfológicas mais comuns da série vermelha, bem como as principais patologias associadas, encontram-se exemplificadas na tabela 13.

Tabela 13: Quadro resumo das alterações morfológicas (poiquilocitoses) dos eritrócitos e patologias mais comuns associadas a cada alteração.(13,18,19) (Fonte: Biomedicina padrão)

Alteração	Imagem	Patologia Associada
Eritrócito normal		
Células em alvo		Ferropénia, Talassemias
Esferócitos		Esferocitose hereditária, Anemia hemolítica
Eliptócitos/Ovalócitos		Eliptocitose
Acantócitos		Hepatopatias
Células em lágrima		Talassemias
Drepanócitos		Anemia falciforme
Estomatócito		Estomatocitose, Hepatopatias

- Medulograma:

O medulograma consiste na observação, ao microscópio ótico, de esfregaços de medula óssea. Ao laboratório chega o aspirado da medula a partir do qual são realizados novos esfregaços de medula, bem como várias lâminas de esfregaços realizados no momento da colheita. Os esfregaços de medula são de seguida corados para observação.

Na sua avaliação observam-se os fragmentos de medula para determinação da celularidade (hipocelular, normocelular ou hipercelular), em relação ao sexo e idade do doente, avaliação da série megacariocítica (presença de megacariócitos) e ainda a homogeneidade da distribuição dos componentes celulares na medula.

Deve também ser feita uma avaliação de alterações morfológicas das três séries, quando presentes, e efetuada uma contagem diferencial das linhas celulares, bem como o cálculo da relação mielóide/eritróide, cujo valor normal é de 3:1.

É também efetuada uma lâmina de um esfregaço de medula corada manualmente pela coloração de Perls, para observação ao microscópio, com o intuito de avaliar os depósitos de ferro na medula. Observam-se a presença ou ausência de depósitos de ferro nos fragmentos medulares bem como nos eritroblastos, e ainda a distribuição dos grânulos de ferro nestes últimos.

- Provas de Coagulação:

A hemostase é o nome dado à resposta fisiológica normal do corpo que tem como objetivo prevenir e interromper uma hemorragia. Assim o processo hemostático consegue assegurar a fluidez sanguínea e a integridade dos vasos sanguíneos. Isto deve-se ao esforço coordenado de 3 mecanismos distintos, mas intimamente relacionados: o mecanismo vascular, as plaquetas e a coagulação sanguínea. (20,21)

Estes mecanismos, quando hiperativos ou inapropriadamente ativados, provocam anomalias que se podem manifestar de duas formas completamente opostas: hemorragias ou trombozes (formação de coágulos sanguíneos).

Atualmente sabe-se que os mecanismos da cascata de coagulação não ocorrem in vivo de forma independente, mas sim de modo interligado, no entanto, o modelo que separa a cascata de coagulação em: via extrínseca, via intrínseca e via comum continua a ser

utilizado como base para se avaliar os mecanismos de coagulação sanguínea in vitro (figura 10). (22,23)

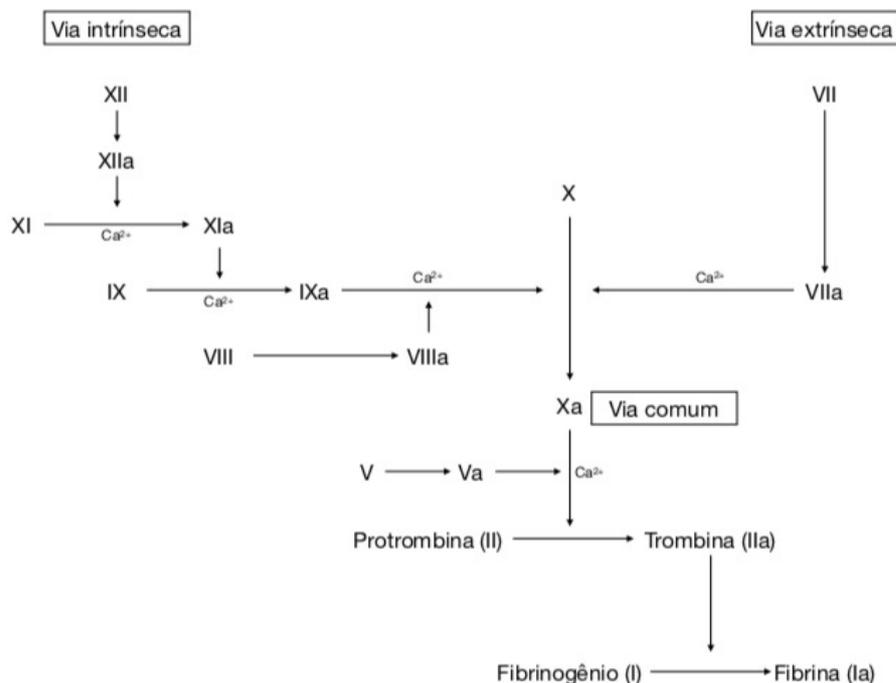


Figura 10: Esquema resumo da cascata de coagulação (Fonte: Medway.com.br)

Os distúrbios da hemostase são diagnosticados com o auxílio dos seguintes exames laboratoriais, que permitem investigar o processo de coagulação. Note-se que para alguns dos testes seguintes é necessário obter um plasma pobre em plaquetas, o que é conseguido pelo processo de centrifugação uma vez que devido à sua densidade estas se vão depositar na parte inferior do tubo, junto com os eritrócitos e leucócitos.

1. Tempo de protrombina (TP):

A determinação do TP é a prova de eleição para a investigação da via extrínseca da coagulação, apresentando uma maior afinidade para os fatores V, VII, X, para a protrombina e para o fibrinogénio.

O método utilizado para realizar este teste consiste na adição de tromboplastina tecidual em excesso e cálcio ao plasma. O tempo decorrido, em segundos, até à formação de um coágulo constitui o valor do TP.(24)

2. Tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa):

A determinação do TTPa é a prova de eleição para a investigação da via intrínseca da coagulação, apresentando uma maior afinidade para os fatores VIII, IX, XI e XII, mas também para a via comum, devido à afinidade com os fatores V, X, protrombina e fibrinogénio.

O método utilizado para realizar este teste consiste em adicionar ao plasma (após centrifugação) cloreto de cálcio e tromboplastina parcial, um substituto fosfolipídico das plaquetas. O tempo decorrido, em segundos, até à formação de um coágulo constitui o valor de TTPa.(24)

3. Tempo de trombina (TT):

A prova do TT é utilizada para determinar alterações na transformação do fibrinogénio em fibrina, pela ação da trombina.

O método utilizado para realizar este teste consiste em adicionar ao plasma uma concentração conhecida de trombina e o tempo decorrido, em segundos, até à formação do coágulo constitui o valor de TT. (24)

4. Anticoagulante lúpico (AL):

A determinação do AL é utilizada para verificar a presença no plasma do doente de auto anticorpos que interferem com a coagulação.

A técnica utilizada para detetar a presença de AL baseia-se no facto deste prolongar os tempos em técnicas de tempos de coagulação dependentes de fosfolípidos, como é o caso do TTPa, tempos esses que não são corrigidos com a mistura com pool de plasma normal (1:1).

Uma especificidade deste teste é o facto de a amostra passar por duas centrifugações, de modo a garantir um plasma com ausência de plaquetas. De seguida são realizados 2 testes diferentes, o reagente de veneno de víbora de Russell diluído (RVVd) e o Silica Clotting Time (SCT), onde para ambos se efetua um screen (baixa concentração de fosfolípidos) e um confirmatório (elevada concentração de fosfolípidos), e é a razão entre o screen e o confirmatório que dá o resultado. Basta que um dos testes (VVRd ou SCT) seja

positivo para a mostra ser considerada positiva, no entanto apenas se os dois testes forem negativos se considera a amostra negativa. (25)

5. D-dímeros (DD):

O DD é um produto da degradação da fibrina, quando ocorre o processo de fibrinólise. A dosagem de DD é normalmente utilizada para excluir a possibilidade de trombose, uma vez que se encontra elevado nestas situações.(26)

6. Fibrinogénio:

O Fibrinogénio é um fator de coagulação (fator I), sendo que a diminuição do fibrinogénio pode ocorrer devido à redução da sua síntese ou por consumo excessivo. As concentrações de fibrinogénio podem encontrar-se aumentadas em casos de inflamação ou infeção pois é uma proteína de fase aguda.

Este método baseia-se no princípio de que o logaritmo do tempo de coagulação é inversamente proporcional ao logaritmo da concentração de fibrinogénio quando se adiciona uma elevada concentração de trombina ao plasma. (24)

7. Proteína C (PC) e Proteína S (PS):

A PC está presente no plasma e a sua síntese é dependente de vitamina K. In vivo é ativada pela ligação da trombina à trombomodulina. Como a proteína C ativada (APC) degrada os fatores Va e VIIIa é considerada um anticoagulante plasmático natural.

A diminuição da PC pode dever-se a causas genéticas ou anormalidades adquiridas e aumenta a predisposição para trombose venosa. (27,28)

No SPCL, a quantidade de APC é determinada pela sua ação sobre um substrato cromogénico.

A PC apresenta-se diminuída em fase aguda de trombose.

A PS é um cofator da APC, vitamina K dependente. (27)

A sua presença é detetada pelo aumento da turvação devido à aglutinação de dois reagentes de látex, sendo que o nível de aglutinação será diretamente proporcional à concentração de PS na amostra em estudo.

- **Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo:**

A imunofenotipagem por citometria de fluxo é uma técnica que permite estudar populações celulares, tendo em conta as suas características físicas e biológicas.

Esta técnica permite avaliar o tamanho, a complexidade e a expressão antigénica das células, sendo que é o conjunto destes parâmetros que permite diferenciar e identificar as populações celulares como normais ou anómalas, auxiliando o diagnóstico e seguimento clínico.(29–31)

A avaliação das características celulares é realizada por citometria de fluxo, ou seja, as células são marcadas com anticorpos ligados a fluorocromos e em seguida a amostra é submetida à leitura pelo citómetro, onde o laser incide sobre cada célula individualmente. Cada célula irá dispersar a luz de forma diferente, de acordo com as características referidas anteriormente. (30–32)

A mesma técnica é utilizada para diferentes doenças, mas para cada uma delas haverá um painel de anticorpos diferente. O médico pode optar pelos painéis pré-definidos ou solicitar um anticorpo específico.

As amostras estudadas incluem sangue periférico, aspirados de medula óssea, e outros líquidos biológicos como: líquido pleural, peritoneal, pericárdico e líquido céfalo-raquidiano e biópsias aspirativas de gânglios e massas.

- **Biologia Molecular:**

- I. Gene de fusão *breakpoint cluster region-Abelson Leukemia (bcr-abl)*:**

○ gene *bcr* está localizado no cromossoma 22 e o gene *abl* no cromossoma 9.

○ gene de fusão *bcr-abl* é formado durante uma divisão celular dentro da medula óssea devido a uma translocação entre o cromossoma 22 e o cromossoma 9. Nesta translocação ocorre quebra dos cromossomas e as

porções rearranjam-se de forma errada, ou seja, juntam-se as duas porções (gene *bcr* e o gene *abl*) no chamado cromossoma de Philadelphia. (33,34)

O teste de pesquisa do gene de fusão *bcr-abl* consiste num ensaio de RT-PCR, onde se vai avaliar em tempo real se o cromossoma de Philadelphia está presente na amostra ou não.

2. Fator II e Fator V de Leiden:

A trombofilia é definida como um risco acrescido para desenvolver coágulos sanguíneos. As mutações genéticas mais frequentemente associadas à trombofilia ocorrem nos genes do Fator V de Leiden e do Fator II. (35)

O Xpert FII & FV é um teste de genotipagem qualitativo para a deteção em tempo real de alelos (RT-PCR) com a mutação 20210G>A do Fator II e da mutação R506Q do Fator V de Leiden.(36)

Casos Clínicos

- **Caso 3:**

Mulher, 38 anos, com anemia microcítica e hipocrômica enviada para o IPO para esclarecimento da mesma. Foram realizadas análises hematológicas, bioquímicas e imunológicas, apresentadas no quadro abaixo (tabela 14).

Tabela 14: Parâmetros analíticos efetuados no SPCL do IPOC no contexto do caso clínico 3. (Fonte: SPCL do IPOCFG)

Parâmetro	Resultado	Intervalo de referência
Leucócitos	$8.3 \times 10^3 \mu\text{L}$	$4.0 - 11.0 \times 10^3 \mu\text{L}$
Neutrófilos	$5.8 \times 10^3 \mu\text{L}$	$1.8 - 7.0 \times 10^3 \mu\text{L}$
Linfócitos	$2.0 \times 10^3 \mu\text{L}$	$1.0 - 5.0 \times 10^3 \mu\text{L}$
Monócitos	$0.3 \times 10^3 \mu\text{L}$	$0.1 - 1.2 \times 10^3 \mu\text{L}$
Eosinófilos	$0.1 \times 10^3 \mu\text{L}$	$0.0 - 0.6 \times 10^3 \mu\text{L}$
Basófilos	$0.1 \times 10^3 \mu\text{L}$	$0.0 - 0.2 \times 10^3 \mu\text{L}$
Eritrócitos	$5.35 \times 10^{12} \mu\text{L}$	$4.0 - 5.5 \times 10^{12} \mu\text{L}$

Hemoglobina	11.7 g/dL	12.0 – 16.0 g/dL
Hematócrito	37.3 %	35.0 – 47.0 %
VCM	69.7 fL	85.0 – 95.0 fL
HCM	21.8 pg	27.0 – 32.0 pg
CHCM	31.3 g/dL	32.0 – 36.0 g/dL
RDW	14.3 %	11.5 – 14.5 %
Plaquetas		
	265 x 10 ³ µL	140 – 400 x 10 ³ µL
Ferro		
	95 µg/dL	60 – 190 µg/dL
Capacidade total de fixação do ferro (TIBC)	296 µg/dL	250 – 410 µg/dL
Saturação da Transferrina	32 %	15 – 45 %
Ácido fólico		
	7.3 ng/mL	3.9 – 26.8 ng/mL
Vitamina B12	419.0 pg/mL	191.0 – 663.0 pg/mL
Ferritina	108.9 µg/L	10.0 – 291.0 µg/L

Como se pode verificar pela análise do quadro anterior, a doente apresenta todos os parâmetros avaliados dentro dos intervalos de referência de normalidade, com exceção dos assinalados a vermelho. Os parâmetros assinalados confirmam a informação prévia da presença de uma anemia hipocrômica microcítica, no entanto não oferecem nenhum esclarecimento sobre a sua origem uma vez que os parâmetros associados aos défices de ferro e vitaminas estão normais.

Realizou-se de seguida um esfregaço de sangue periférico para avaliar a morfologia dos elementos figurados do sangue (figura 11).

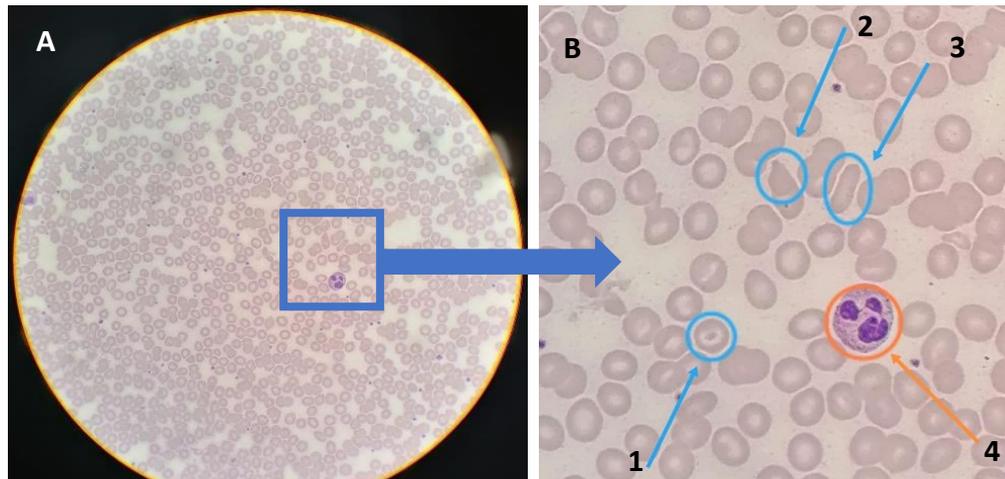


Figura 11: A – Esfregaço de sangue periférico numa ampliação de 40x com recurso ao microscópio ótico; B – Ampliação da área marcado do esfregaço em A para visualização de célula em lágrima (1), célula em lágrima (2), ovalócitos (3) e neutrófilo (4). (Fonte: SPCL do IPOCFG)

Neste esfregaço observamos microcitose e hipocromia, com algumas células em alvo, raras células em lágrima e raros ovalócitos. Em relação à linha branca salientou-se que os neutrófilos apresentavam ligeira granulação tóxica citoplasmática, sendo alguns vacuolizados.

Tendo em conta todos os resultados anteriormente expostos, bem como a ausência de outra patologia suscetível de provocar os mesmos, suspeitou-se da possibilidade de se tratar de uma β -talassemia menor pois os heterozigotos que apresentam um alelo normal de betaglobina e um alelo betatalassêmico são clinicamente normais, mas exibem um quadro hematológico anormal, que pode levar a um diagnóstico incorreto de déficit de ferro.(37)

Para perceber se esta suspeita seria uma hipótese de diagnóstico efetuamos um estudo eletroforético das hemoglobinas, onde se obteve um ligeiro aumento percentual da fração Hb A2 (figura 12).

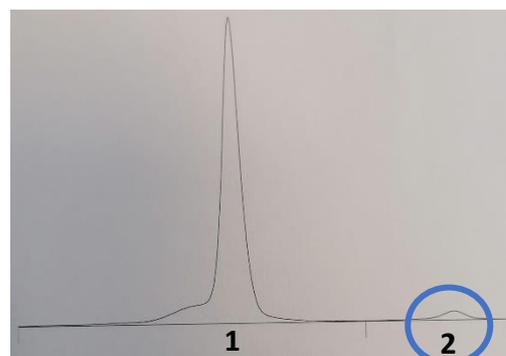


Figura 12: Perfil eletroforético das hemoglobinas, com pico de 96,4% da fração Hb A (1) e pico de 3,6% da fração Hb A2 (2). (Fonte: SPCL do IPOCFG)

Nas β -talassemias minor quando se efetua a análise das variantes de Hb a Hb A2 está ligeiramente elevada, com valores de 3.6% (valor normal é entre 0,0 – 3,5) que vai de encontro uma vez mais às suspeitas de diagnóstico.

Para que seja dado um diagnóstico definitivo é necessário que seja efetuado um estudo genético, no entanto os resultados obtidos são sugestivos de se tratar de uma β -talassemia minor.

- **Caso 4:**

Doente do sexo feminino, 67 anos, seguida no IPOCFG por carcinoma da mama esquerda, diagnosticado em setembro de 2014. Encontra-se a fazer seguimento anual quando apresenta uma nova leucocitose em análises de vigilância (tabela 15).

Tabela 15: Parâmetros analíticos efetuados no SPCL do IPOC no contexto do caso clínico 4. (Fonte: SPCL do IPOCFG)

Parâmetro	Resultado	Intervalo de referência
Leucócitos	89.0 × 10 ³ µL	4.0 – 11.0 × 10 ³ µL
Neutrófilos	51.6 × 10 ³ µL	1.8 – 7.0 × 10 ³ µL
Linfócitos	5.3 × 10 ³ µL	1.0 – 5.0 × 10 ³ µL
Monócitos	4.4 × 10 ³ µL	0.1 – 1.2 × 10 ³ µL
Eosinófilos	0.9 × 10 ³ µL	0.0 – 0.6 × 10 ³ µL
Basófilos	1.8 × 10 ³ µL	0.0 – 0.2 × 10 ³ µL
Blastos	1%	<0%
Promielócitos	1%	<0%
Mielócitos	13.0 %	<0%
Metamielócitos	4%	<0%
Neutrófilos em Bastão	8%	<0%
Eritroblastos	2%	<0%
Eritrócitos	3.77 × 10 ¹² µL	4.0 – 5.5 × 10 ¹² µL
Hemoglobina	11.7 g/dL	12.0 – 16.0 g/dL
Hematócrito	37.9 %	35.0 – 47.0 %
VCM	100.6 fL	85.0 – 95.0 fL
HCM	31.0 pg	27.0 – 32.0 pg
RDW	19.0 %	11.5 – 14.5 %

Plaquetas	224 x 10 ³ µL	140 – 400 x 10 ³ µL
Velocidade de Sedimentação	27 mm/h	<=20 mm/h

Como se pode verificar pela análise do quadro anterior, a doente apresenta alguns valores fora dos intervalos de referência de normalidade, assinalados a vermelho. Por esse motivo efetuámos um esfregaço de sangue periférico de modo a confirmar não só a contagem diferencial dos leucócitos, mas também a morfologia das células (figura 13).

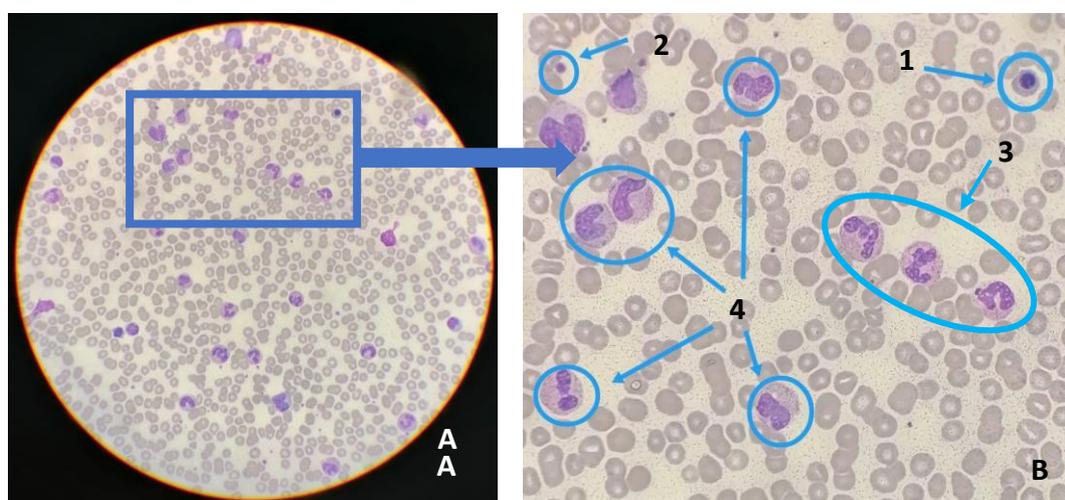


Figura 13: A – Esfregaço de sangue periférico numa ampliação de 40x com recurso ao microscópio ótico. B – Ampliação da área marcada do esfregaço em A para visualização de eritroblastos (1), plaquetas gigantes (2), neutrófilos com alterações da segmentação nuclear (3), formas imaturas da linha mielóide (4) (Fonte: SPCL do IPOCFG)

No esfregaço de sangue, em relação aos eritrócitos foram observadas células crenadas e eritroblastos em diversos estádios maturativos. Verificou-se também uma anisocitose plaquetar, com presença de plaquetas macrocíticas/gigantes. Quanto à série branca, mais concretamente a série mielóide, que é a que se encontra aumentada, observaram-se neutrófilos com alterações inespecíficas da segmentação nuclear (Hipo/hiperlobulação) com a presença de granulação citotóxica, eosinófilos com raras formas imaturas e basófilos hipogranulados, para além da presença de formas imaturas da linha de neutrófilo (mielémia) e basofilia.

O anteriormente observado parecia ser sugestivo de Leucemia Mielóide Crónica (LMC), pelo que foi sugerido ao clínico a realização de um teste de Biologia molecular

para a pesquisa do gene de fusão *bcr-abl*, também conhecido como cromossoma de Philadelphia. A fusão do gene *bcr-abl* dá início à produção de uma proteína anormal, uma enzima chamada BCR-ABL tirosina quinase. A presença desta proteína anormal é a causa da mieloproliferação na medula óssea. Cerca de 95% dos doentes com diagnóstico de LMC tem o cromossoma de Philadelphia, ou seja, o gene *bcr-abl*. (34,38,39)

O teste de RT-PCR para a pesquisa do gene *bcr-abl* deu positivo, confirmando as nossas suspeitas e permitindo ao clínico efetuar o diagnóstico de LMC.

Bioquímica Clínica

O setor da Bioquímica está sob a coordenação da Dr^a Zósima Pinto e engloba a determinação de vários parâmetros, que fornecem informações sobre o funcionamento de múltiplos órgãos.

Neste setor as amostras mais comuns são o soro e o sangue total, no entanto também são feitas determinações de alguns parâmetros em amostras de urina de 24h e outros líquidos biológicos, como o líquido ascítico, entre outros. Todos os parâmetros são determinados recorrendo a vários equipamentos automáticos que auxiliam a rotina diária do SPCL (Tabela 16).

Tabela 16: Lista dos principais equipamentos do Setor da Bioquímica no SPC do IPOCFG e respetivas funções/especificidades

Equipamento	Função e Especificações
Atellica CH930 (Siemens)	Autoanalisador de química clínica
ABL 800 FLEX (Radiometer®)	Calcímetro e Gasómetro
RapidChem™ 744 (Bayer®)	Equipamento automático para a realização de ionogramas confirmatórios
Reflotron®Plus (Roche® Diagnostics)	Equipamento para análises de química seca confirmatórios
Viva – E™ (Siemens)	Equipamento automatizado para análises de fármacos terapêuticos

As provas realizadas auxiliam o clínico no diagnóstico, mas permitem principalmente, uma monitorização do estado de saúde do doente e da terapêutica a que o mesmo está sujeito. Os parâmetros bioquímicos podem dar indicações do funcionamento de órgãos como o coração, o rim, o fígado e o pâncreas.

Nos doentes oncológicos, que são a população principal do SPCL do IPOCFG, o controlo referido anteriormente é de extrema importância pois todos os tratamentos a que estão sujeitos (como a quimioterapia, entre outros) podem afetar o normal funcionamento dos órgãos ou sistemas.

Provas Realizadas:

- Calcímetro (ABL 800 Flex):

O calcímetro avalia o valor de Cálcio ionizado (Ca^{2+}) e o pH da amostra (em sangue total).

O Ca^{2+} é a forma fisiologicamente ativa do cálcio e é essencial em diversas funções fisiológicas como cofator de inúmeras reações enzimáticas sendo por este motivo um parâmetro muito doseado no SPCL. (40)

Em conjunto avalia-se também o pH da amostra, pois, de maneira a uniformizar os resultados, o valor de cálcio ionizado é sempre dado em função de um pH de 7,4. Quando o pH da amostra difere deste valor é feito um cálculo matemático do valor previsto para um pH de 7,4.

- Gasómetro (ABL 800 FLEX):

A gasometria consiste num conjunto de parâmetros que avaliam o equilíbrio ácido-base do doente, bem como a oximetria, eletrólitos e metabolitos, utilizando uma amostra de sangue arterial. Este é um exame invasivo, que tem como objetivo avaliar os valores de pH sanguíneo, da pressão parcial do dióxido de carbono (PaCO_2) e oxigénio (PaO_2), do ião bicarbonato (HCO_3^-), entre outros. (41)

Pelo facto de se utilizar sangue arterial, a amostra é colhida por um médico em seringa com heparina de lítio, e enviada ao SPCL no menor tempo possível, sendo processada com carácter de urgência. É necessária uma homogeneização vigorosa da amostra antes da sua colocação no aparelho bem como uma avaliação do estado da mesma, verificando-se, por exemplo, a presença de bolhas de ar. A fase pré-analítica é de extrema importância para a gasometria.

- Atellica CH930:

É neste equipamento que são realizados a maioria dos testes do setor da Bioquímica. É um autoanalisador massivo de química clínica. Possui mais de 200 ensaios altamente específicos e sensíveis, e tem a capacidade de efetuar análises em soro, plasma, urina e sangue total, assim como noutros líquidos biológicos (tabela 17).

Tabela 17: Quadro resumo dos parâmetros realizados pelo aparelho Atellica no setor da Bioquímica do SPCL do IPOC. (42)

Parâmetro	Tipo de amostra	Patologias associadas
Ácido úrico	Soro, plasma e urina	Insuficiência renal, gota e eclâmpsia.

Albumina	Soro e plasma	Doenças inflamatórias crônicas, disfunções de colagénio e disfunções hepáticas e renais.
Amilase	Soro, plasma e urina	Pancreatite aguda.
Amónia	Plasma	Doença hepática, insuficiência renal crónica e síndrome de Reye.
Bilirrubina Direta	Soro e plasma	Disfunções hepáticas e icterícia.
Bilirrubina total	Soro e plasma	Hepatite e doença hepática (doença da vesícula biliar).
Cálcio	Soro, plasma e urina	Doença paratiroide, doenças ósseas e insuficiência renal crónica.
Capacidade total de fixação do ferro (TIBC)	Soro	Anemia.
Colesterol HDL	Soro e plasma	Doença coronária.
Colesterol LDL	Soro e plasma	Doença coronária.
Colesterol total	Soro e plasma	Distúrbios do metabolismo de lípidos e lipoproteínas.
Creatina quinase	Soro e plasma	Enfarte do miocárdio e doenças musculares (distrofia muscular progressiva de Duchenne).
Creatinina	Soro, plasma e urina	Doenças renais.
Ferro	Soro e plasma	Anemias por deficiência de ferro e hemocromatose.
Fosfatase ácida	Soro	Carcinoma da próstata.
Fosfatase alcalina	Soro e plasma	Doenças hepáticas, ósseas, paratiroideas e intestinais.
Fósforo Inorgânico	Soro, plasma e urina	Doenças renais, disfunções da glândula paratiroide e deficiência de Vitamina D.
Gama-glutamil transferase (GGT)	Soro e plasma	Doença hepatobiliar e problemas de alcoolismo.
Glucose	Soro, líquido cefalorraquidiano, plasma e urina	Distúrbios do metabolismo de hidratos de carbono (diabetes mellitus).
Hemoglobina glicada (HbA1c)	Sangue total (com EDTA)	Diabetes mellitus.
Lactato desidrogenase (LDH)	Soro e plasma	Enfarte do miocárdio e enfarte pulmonar.

Lipase	Soro e plasma	Doenças do pâncreas (pancreatite aguda e obstrução do ducto).
Magnésio	Soro, plasma e urina	Hipomagnesemia e hipermagnesemia.
Microalbumina	Urina	Microalbuminúria e doença renal.
Multisensor Integrado Sódio, Potássio e Cloro	Soro, plasma e urina	Aldosteronismo, diabetes insipidus, hipertensão de causa suprarrenal, doença de Addison e doenças que envolvam um desequilíbrio de eletrólitos.
Pré-albumina	Soro	Estado nutricional do paciente.
Proteínas totais	Soro e plasma	Doenças hepáticas, renais e distúrbios metabólicos e nutricionais.
Triglicerídeos	Soro e plasma	Diabetes mellitus, nefrose, obstrução hepática e distúrbios endócrinos.
Ureia	Soro, plasma e urina	Doença renal, obstrução do trato urinário e insuficiência renal aguda ou crônica.

- Técnicas Manuais:

Neste setor são ainda efetuadas algumas análises por técnicas manuais. Tratam-se de testes de aglutinação caracterizados pela formação de agregados visíveis como resultado da interação de anticorpos específicos e partículas insolúveis que contêm determinados antígenos na superfície.

As vantagens destes ensaios são a sua elevada especificidade e reprodutibilidade, bem como o baixo custo e fácil execução, no entanto, apresentam uma baixa sensibilidade e podem ser de difícil interpretação. (43)

O teste mais pedido durante a minha passagem pelo setor, foi o teste da Reagina Plasmática Rápida (RPR), um teste de aglutinação não treponémico. Este método imunológico é usado para identificar e monitorizar doentes portadores de sífilis, uma doença sexualmente transmissível, causada pela bactéria *Treponema pallidum*. (44)

Imunologia e Hormonologia

No SPCL do IPOCFG as áreas de Imunologia, Hormonologia e Serologia encontram-se combinadas num único setor, que tem como responsável o Dr. Nuno Alexandre Costa Ferreira da Cunha, TSS especialista em Análises Clínicas pela ordem dos Biólogos.

Este setor é responsável pelo doseamento de marcadores tumorais, hormonas, marcadores cardíacos, vitaminas e proteínas de fase aguda. Também aqui são realizados os estudos de função hormonal com o intuito de complementar o diagnóstico diferencial das patologias endócrinas e são realizados estudos de autoimunidade, com a pesquisa de autoanticorpos específicos.

Para além dos métodos imunoquímicos efetuados em equipamentos totalmente automatizado, também são realizados estudos eletroforético de proteínas séricas, imunofixações para a caracterização de gamapatias monoclonais no soro e na urina de 24 horas (proteinúria de Bence-Jones) estudos do perfil eletroforético da hemoglobina, isoenzimas da fosfatase alcalina e da lactato desidrogenase. Estes métodos analíticos são semiautomáticos, uma vez que o tratamento prévio e a pipetagem da amostra manual, mas a migração, coloração, fixação e leitura dos resultados é totalmente automatizada.

O tipo de amostras biológicas maioritariamente utilizadas neste setor são: soro, plasma e urina (pontual ou de 24 horas, dependendo do estudo a efetuar), embora também se doseiem parâmetros em outros líquidos biológicos (saliva, líquido ascítico e aspirados ganglionares).

Embora este seja um setor muito automatizado (tabela 18), ainda há algumas técnicas realizadas manualmente, como a metanefrina, normetanefrina plasmáticas e a 17-OH-progesterona, que recorrem à utilização de imunoensaios por radioisótopos (1125).

Tabela 18: Lista dos principais equipamentos do Setor da Imunologia e Hormonologia do SPC do IPOCFG e respetivos métodos/funções.

Equipamento	Método/Função
Immulite2000 ®XPI + VersaCell™ da Siemens	Equipamento automático de imunoensaios por quimioluminescência (CLIA)

ADVIA Centaur® XPT da Siemens	Equipamento automático de imunoensaios por quimioluminescência (CLIA)
B R A H M S KRYPTOR GOLD da Thermo Fisher Scientific	Equipamento automático de imunoensaios de fluorescência por <i>Time-Resolved Amplified Cryptate Emission</i> (TRACE)
Cobas e601 Analyser® da Roche® Diagnostics	Equipamento automático de imunoensaios por eletroquimioluminescência (ECLIA)
Cobas e801 Analyser® da Roche Diagnostics	Equipamento automático de imunoensaios por eletroquimioluminescência (ECLIA)
Atellica NEPH 630 da Siemens	Equipamento automático de imunoensaios por neflometria
Optilite® da Binding Site	Equipamento automático de imunoensaios por turbidimetria
IDS-iSYS Multi-Discipline Automated System da EUROIMMUN	Equipamento automático de imunoensaios por <i>Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique</i> (CLIA)
Hydrasys® da Sebia®	Analisador multifuncional de eletroforeses em gel
Phadia 200 da Thermo Fisher SCIENTIFIC	Equipamento automático de imunoensaios de FEIA
Analyzer I-2P da EUROIMMUN	Equipamento automático de imunoensaios de ELISA
Wallac Wizard 1470 gamma counters	Detetor de radioisótopos (RIA ou IRMA)
IF Sprinter da EUROIMMUN	Preparador automático de lâminas para estudos por imunofluorescência
EUROBlotOne da EUROIMMUN	Equipamento de Ensaios por Imunoblot (<i>western blotting</i>)
Elisa reader da DiaSource ImmunoAssays	Leitor de placas de ELISA

Marcadores tumorais:

No IPOC os marcadores tumorais são dos parâmetros mais doseados no setor de Imunologia e Hormonologia devido à especificidade dos doentes desta Instituição. Os marcadores tumorais são essencialmente proteínas, hormonas ou outras moléculas, que quando se encontram sobreexpressas, podem indicar a presença de células tumorais malignas. Existem

dois tipos de marcadores tumorais, os marcadores tumorais circulantes e os marcadores tumorais tecidulares. (45,46)

De forma geral, os marcadores tumorais são utilizados na prática clínica para a triagem, prognóstico, monitorização terapêutica e detecção precoce de possíveis recidivas da doença. Quando usadas em painel os marcadores tumorais podem ajudar a complementar estudos imagiológicos ou sinais e sintomas sugestivos de patologia oncológica, uma vez que por vezes estes marcadores podem apresentar aumentos inespecíficos em situações benignas. (45–47)

Estes parâmetros são quantificados por imunoensaios, que se baseiam na detecção da formação de complexos antigénio-anticorpo através de diferentes metodologias, conforme o princípio e forma de detecção. Podemos assim diferenciar dois princípios básicos: os ensaios competitivos e os ensaios não competitivos ou *sandwich*.

A utilização de um método, competitivo ou não-competitivo, geralmente está associada às características do antigénio (massa molecular e número de epítomos imunogénicos).

A forma de detecção varia conforme o método do equipamento utilizado.

Conclusão

Este relatório diz respeito a uma pequena parte do conhecimento adquirido durante o estágio no SPCL do IPOCFG. Estaria a mentir se dissesse que o mesmo não começou com um sentimento de medo e insegurança, no entanto rapidamente percebi que a formação prévia, adquirida durante o Mestrado em Análises Clínicas, eram uma base mais do que suficiente para conseguir integrar-me e aprofundar esse conhecimento.

Permitiu-me conhecer e fazer parte da dinâmica diária de um laboratório de análises clínicas, da realidade particular que é o IPO e dos próprios casos clínicos onde o nome da doença é assustador, mas o trabalho de toda a equipa contribui para a melhor prestação de cuidados de saúde possível para todos os doentes.

A realização deste relatório de estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas marca o fim de uma importante etapa e começo de uma nova. A escola de vida que este estágio foi no que diz respeito à moralidade e relacionamentos interpessoais, ficam fora do relatório, mas para sempre comigo, como a melhor preparação que podia ter tido para a vida profissional futura que me espera.

Foram dois anos de muito estudo e dedicação, onde aprendi algo novo todos os dias, e o balanço final não pode deixar de ser positivo, considero que alcancei todos os objetivos que me foram propostos e sem dúvida excedeu as minhas expectativas.

Após tudo o que referi anteriormente, só me resta concluir que fiz a escolha certa para o meu futuro profissional pois quando estou no laboratório sinto-me feliz, útil e principalmente realizada.

Referências Bibliográficas

1. Konieczka P, Namiesnik J. *Quality assurance and quality control in the analytical chemical laboratory*. CRC Press; 2016.
2. Biswas BB, Basu PS, Pal MK. *Gram staining and its molecular mechanism*. In 1970. p. 1–27.
3. Moyes RB, Reynolds J, Breakwell DP. *Differential staining of bacteria: Gram stain*. *Curr Protoc Microbiol*. 2009 Nov;15(1).
4. Madison B. *Application of stains in clinical microbiology*. *Biotechnic & Histochemistry*. 2001 Jan 12;76(3):119–25.
5. Van Deun A, Hossain MA, Gumusboga M, Rieder HL. *Ziehl-Neelsen staining: theory and practice*. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008 Jan;12(1):108–10.
6. Allen JL. *A modified Ziehl-Neelsen stain for mycobacteria*. *Medicine Laboratory Science*. 1992 Jun;49(2):99–102.
7. EUCAST. Available from: <https://www.eucast.org/>
8. Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. *A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection*. *N Engl Journal of Medicine*. 1977 Jun 9;296(23):1305–9.
9. Fonseca A. *Orientações para a Elaboração de um Manual de Boas Práticas em Bacteriologia*. Ministério da Saúde/Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Portugal; 2004.
10. Akorsu EE, Adjabeng LB, Sulleymana MA, Kwadzokpui PK. *Variations in the full blood count parameters among apparently healthy humans in the Ho municipality using ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), sodium citrate and lithium heparin anticoagulants: A laboratory-based cross-sectional analytical study*. *Heliyon*. 2023 Jun 1;9(6):e17311.
11. Goossens W, Duppen V, Verwilghen RL. *K2- or K3-EDTA: the anticoagulant of choice in routine haematology?* *Clinical Laboratory Haematology*. 2008 Jun 28;13(3):291–5.
12. Banfi G, Salvagno GL, Lippi G. *The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes*. *Clinical Chemical Laboratory Medicine*. 2007 Jan 1;45(5).
13. Torrens MP. *Interpretación clínica del hemograma*. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2015 Nov 1;26(6):713–25.
14. Billett HH. *Hemoglobin and hematocrit. in: clinical methods: the history, physical, and laboratory examinations*. 3rd edition. 1990.
15. Koepke JF, Koepke JA. *Reticulocytes*. *Clinical Laboratory Haematology*. 1986 Sep;8(3):169–79.
16. Mcdonald GA, Cruickshank B, Paul J. *Atlas de hematología*. 5ª Edição. 1988.
17. Carvalho CB. *Corantes e anticoagulantes hematológicos*. Academia de Ciência e Tecnologia. 16 set. 2019.
18. Naoum PC, Naoum FA. *Interpretação laboratorial do hemograma*. São José do Rio Preto, Brazil; 2008. *Hematologia Laboratorial. Eritrócitos*. 2º Ed. Ed. Act
19. Xavier G, Barreto G, Pimentel R, Albertim G. *Alterações hematológicas em hemogramas de pacientes portadores de hemoglobinopatias*. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2022 Oct;44:S556.
20. Boon GD. *An overview of hemostasis*. *Toxicology Pathology*. 1993;21(2):170–9.
21. Baker DC, Brassard J. *Review of continuing education course on hemostasis*. *Toxicology Pathology*. 2011 Jan 3;39(1):281–8.
22. Hoffman M. *Remodeling the blood coagulation cascade*. *J Thromb Thrombolysis*. 2003 Aug; 16(1–2):17–20.

23. Boon GD. *An overview of hemostasis. Toxicology Pathology.* 1993 Mar 2;21(2):170–9.
24. Dados em ficheiro da HemosIL - Werfen.
25. Campos MM, Santos IR. *Hypoprothrombinemia–lupus anticoagulant syndrome. Acta Medicine Port.* 2011; 24:611–6
26. Weitz JI, Fredenburgh JC, Eikelboom JW. *A test in context: D-Dimer. J Am Coll Cardiology.* 2017 Nov 7; 70(19):2411–20.
27. Stern D, Brett J, Harris K, Nawroth P. *Participation of endothelial cells in the protein C-protein S anticoagulant pathway: the synthesis and release of protein S. J Cell Biol.* 1986 May 1;102(5):1971–8.
28. Esmon CT. *The protein C pathway. Chest.* 2003 Sep;124(3):26S-32S.
29. Craig FE, Foon KA. *Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. Blood.* 2008 Apr 15;111(8):3941–67.
30. Boldt A, Borte S, Fricke S, Kentouche K, Emmrich F, Borte M, et al. *Eight-color immunophenotyping of T-, B-, and NK-cell subpopulations for characterization of chronic immunodeficiencies. Cytometry B Clin Cytom.* 2014 May;86(3):191–206.
31. Bleesing JJH, Fleisher TA. *Immunophenotyping. Semin Hematology.* 2001 Apr;38(2):100–10.
32. Stewart CC, Stewart SJ. *Immunophenotyping. Curr Protoc Cytom.* 1997 Apr;00(1).
33. Groffen J, Heisterkamp N. *The BCR/ABL hybrid gene. Baillieres Clinical Haematology.* 1987 Dec 1;1(4):983–99.
34. Oliveira M, Silva A, Viana V, ... LR. *Valor do cycle threshold (CT) em pacientes detectáveis para o gene bcr-abl em leucemia mieloide crônica (LMC) por PCR em tempo real. Elsevier 2022.*
35. Mannucci PM, Franchini M. *Classic thrombophilic gene variants. Thromb Haemostase.* 2015 Nov;114(5):885–9.
36. Xpert® FII & FV. Available from: <https://www.cepheid.com/pt-PT/tests/oncology-human-genetics/xpert-fii-fv.html>
37. Williamson AM, Snyder LM. *WALLACH: Interpretação de exames laboratoriais-10ªED.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2016.
38. Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, Donato N, Nicoll J, Paquette R, et al. *Dasatinib in imatinib-resistant philadelphia chromosome–positive leukemias. New England Journal of Medicine.* 2006 Jun 15;354(24):2531–41.
39. Vendrame-Goloni CB, Carvalho-Salles AB, Ricci O, Carlos J, Miguel E, Fett-Conte AC. *Análise do rearranjo BCR/ABL por bandamento GTG e FISH: comparação das frequências ao diagnóstico da LMC. 2006; 13(1):7–11.*
40. Sava L, Pillai S, More U, Sontakke A. *Serum calcium measurement: Total versus free (ionized) calcium. Indian Journal of Clinical Biochemistry.* 2005 Jul;20(2):158–61.
41. Mota IL, Queiroz RS. *Distúrbios do equilíbrio ácido básico e gasometria arterial: uma revisão crítica. Brazilian Journal of Health Review.* 2010.
42. Dados em ficheiro da Siemens Healthcare Diagnostics.
43. Blake C, Analyst BG, 1984. *Use of enzymes in immunoassay techniques. A review. 1984; 109.*
44. Nayak S, Acharjya B. *VDRL test and its interpretation. Indian J Dermatol.* 2012;57(1):3.
45. Duffy MJ. *Clinical uses of tumor markers: a critical review. Crit Rev Clinical Laboratory Science.* 2001 Jan 29;38(3):225–62.
46. Nagpal M, Singh S, Singh P, Chauhan P, Zaidi M. *Tumor markers: a diagnostic tool. Natl J Maxillofac Surg.* 2016;7(1):17.
47. Bates SE. *Clinical applications of serum tumor markers. Ann Intern Medicine.* 1991 Oct 15;115(8):623–38.