



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Bárbara Sofia Mendes Pires

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos Silva e pelo Doutor Nuno Alexandre Costa Ferreira da Cunha e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho de 2023



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Bárbara Sofia Mendes Pires

Relatório de Estágio
Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas,
orientado pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos Silva e pelo Doutor Nuno
Alexandre Costa Ferreira da Cunha e apresentado à Faculdade de Farmácia da
Universidade de Coimbra

Julho de 2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, irmã e restante família, por estarem sempre presentes ao longo do meu percurso académico e da minha vida.

Ao meu namorado, que sempre me apoiou e deu força nos momentos mais difíceis com todo o carinho.

Aos meus colegas e amigos de licenciatura e mestrado por todos os momentos partilhados.

À faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e a todos os docentes do Mestrado em Análises Clínicas por todo o conhecimento transmitido, especialmente à Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos Silva pela orientação na elaboração deste relatório de estágio.

Ao Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E. pelo acolhimento e conhecimento transmitido durante a realização deste estágio, em particular ao Dr. Nuno Cunha pela orientação e aos meus coorientadores Dr. Jorge Reis, Dra. Ana Catarina Fonseca, Dra. Micaela Batista e ao Dr. Nuno Gonzaga.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABELAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE ABREVIATURAS/ SIGLAS	11
1. INTRODUÇÃO	17
2. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO	17
2.1. FASE PRÉ-ANALÍTICA.....	18
2.2. FASE ANALÍTICA.....	18
2.3. FASE PÓS-ANALÍTICA.....	18
3. CONTROLO DE QUALIDADE	19
3.1. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO	19
3.2. CONTROLO DE QUALIDADE EXTERNO	19
4. HEMATOLOGIA	20
4.1. COLHEITAS E AMOSTRAS.....	20
4.1.1. Sangue.....	20
4.1.2. Colheitas a quente.....	20
4.2. ANÁLISES EFETUADAS.....	22
4.2.1. Hemograma.....	22
4.2.2. Esfregaço de sangue periférico	24
4.2.3. Velocidade de sedimentação eritrocitária.....	27
4.2.4. Homeostase	28
4.3. CASOS CLÍNICOS.....	30
4.3.1. Caso Clínico 1	30
4.3.2. Caso Clínico 2.....	33
5. BIOQUÍMICA	35
6. IMUNOLOGIA E HORMONOLOGIA	36
7. MICROBIOLOGIA	38
7.1. IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS.....	40
7.1.1. Exame Direto e Colorações	41
7.1.2. Meios de cultura.....	42
7.1.3. Provas Bioquímicas	44
7.2. TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	45
7.2.1. Testes manuais de determinação da suscetibilidade a antimicrobianos	45

7.3. ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	46
7.4. CASO CLÍNICO.....	55
8. CONCLUSÃO	59
9. BIBLIOGRAFIA	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da realização de um esfregaço de sangue periférico. A: Gota de sangue na extremidade da lâmina, com a lâmina que promoverá o esfregaço inclina-se a 45 graus, recua-se (B) e promove-se a extensão (C, D). O esfregaço ideal deve ter bordas laterais livres e um fim em forma de semicírculo.....	24
Figura 2: Esquema ilustrativo da cascata da coagulação sanguínea onde é possível observar as vias intrínsecas (contacto), extrínseca e comum. O TTPA testa as vias intrínsecas e comum, o TP testa as vias extrínsecas e comum e o TT testa inibidores da trombina e deficiência do fibrinogénio.....	29
Figura 3: Imagens microscópicas do esfregaço de sangue periférico do doente onde é possível observar a presença de Blastos.....	32
Figura 4: Imagem microscópica do esfregaço de medula da doente corado com a coloração de Perls, onde é possível observar eritroblastos com sideroblastos em anel.....	34
Figura 5: Placa de COS com colónias puras de bactérias Gram positiva β -hemolítica.....	57
Figura 6: Placa de CLED com colónias puras de bactérias Gram negativa.....	57
Figura 7: Observação de esfregaço com coloração de Gram	57
Figura 8: Placa de COS com colónias puras de bactérias Gram positiva β -hemolítica	58
Figura 9: Placa de CLED com colónias puras de bactérias Gram negativa.....	58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Equipamentos disponíveis no setor de Hematologia.....	20
Tabela 2: Resultados do hemograma de um indivíduo com aglutininas frias	21
Tabela 3: Variações mais frequentes no tamanho dos eritrócitos (anisocitose) que podem ser observados e algumas causas.....	25
Tabela 4: Algumas das variações mais frequentes na forma dos eritrócitos (poiquilocitose) que podem ser observados e algumas causas.....	25
Tabela 5: Algumas causas da alteração da quantidade de leucócitos.....	26
Tabela 6: Algumas causas da alteração da quantidade de plaquetas.....	27
Tabela 7: Resultados das análises laboratoriais caso clínico 1	31
Tabela 8: Resultados das análises laboratoriais caso clínico 2.....	33
Tabela 9: Equipamentos disponíveis no setor de Bioquímica.....	36
Tabela 10: Equipamentos disponíveis no setor de Imunologia e Hormonologia.....	37
Tabela 11: Equipamentos disponíveis no setor de Microbiologia.....	40
Tabela 12: Meios utilizados no setor de microbiologia do SPCL e os seus princípios.....	42
Tabela 13: Provas bioquímicas utilizadas no setor de microbiologia do SPCL.....	44
Tabela 14: Sistema de avaliação de qualidade de amostra segundo critérios de Murray e Washington.....	49
Tabela 15: Interpretação de um esfregaço corado pela coloração de Kinyoun para pesquisa de B.A.A.R.....	50
Tabela 16: Resultados das análises laboratoriais.....	55
Tabela 17: Resultados da sumária de urina e do sedimento urinário realizados à urina das nefrostomias direita e esquerda.....	56
Tabela 18: Resultados do teste de suscetibilidade a antimicrobianos ao MRSA e à <i>Raoutella planticola</i>	58

RESUMO

O presente relatório de estágio curricular, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, refere-se ao estágio realizado no Serviço de Patologia Clínica Laboratorial do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E. (IPOCFG, E.P.E.) e tem como objetivo descrever toda a aprendizagem adquirida.

Este estágio englobou as diversas áreas analíticas, nomeadamente a de Microbiologia, Bioquímica, Imunologia e Hematologia, sendo que será realizada uma abordagem mais aprofundada das áreas de Hematologia e de Microbiologia e uma abordagem mais sucinta das áreas de Bioquímica e de Imunologia.

No decorrer deste estágio tive a oportunidade de aperfeiçoar e consolidar a minha capacidade crítica através da interpretação de resultados obtidos, neste âmbito no relatório consta a apresentação e discussão de diversos casos clínicos que surgiram no decorrer do estágio curricular nas áreas de maior aprofundamento.

Palavras-chave: Microbiologia, Hematologia, Bioquímica, Imunologia, Análises Clínicas, Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil.

ABSTRACT

This curricular internship report, within the scope of the Master's Degree in Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra, refers to the internship carried out at the Clinical Laboratory Pathology Service of the Portuguese Institute of Oncology of Coimbra Francisco Gentil, E.P.E. (IPOCFG, E.P.E.) aims to describe all the learning acquired.

This internship encompassed the various analytical areas, namely Microbiology, Biochemistry, Immunology and Hematology, with a more in-depth approach to the areas of Hematology and Microbiology and a more succinct approach to the areas of Biochemistry and Immunology

During this internship I had the opportunity to improve and consolidate my critical capacity through the interpretation of results obtained, in this context the report contains the presentation and discussion of several clinical cases that emerged during the curricular internship in the areas of greater depth.

Keywords: Microbiology, Hematology, Biochemistry, Immunology, Clinical Analysis, Portuguese Institute of Oncology of Coimbra Francisco Gentil.

LISTA DE ABREVIATURAS/ SIGLAS

AAG - α 1-glicoproteína ácida

AAT- α 1-antitripcina

ACTH - Hormona Adrenocorticotrófica, do inglês *Adrenocorticotropic Hormone*

AFP - α -fetoproteína

ANDRO - Androestenediona

ASLn - Título de anti-estreptolosa O

ATA - Anticorpo Anti-Peroxidase

ATG - Anticorpo Anti-Tiroglobulina

ATSHR - Anticorpos anti-reatores da TSH

B.A.A.R - Bacilos ácido-álcool resistentes

BETA-HCG - Beta Gonadotrofina Coriônica Humana, do inglês *Beta Human Chorionic Gonadotropin*

BHI - *Brain Heart Infusion*

BMG - β 2-Microglobulina

C4 - Complemento 4

CA 125 - Antígeno Carbohidrato 125, do inglês *Carbohydrate Antigen 125*

CA 15.3 - Antígeno Carbohidrato 15.3, do inglês *Carbohydrate Antigen 15.3*

CA-19.9 - Antígeno Glucídico 19.9, do inglês *Cancer Antigen 19.9*

CA-72.4 - Antígeno Glucídico 72.4, do inglês *Cancer Antigen 72.4*

CEA - Antígeno arcinomaembrionário, do inglês *Carcinoembryonic antigen*

CGA - Cromogranina A

CHUC - Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

CK-MB - Creatinina Quinase-MB

CLED - Gelose Cistina, Lactose, Deficiente em Eletrólitos

CNA - Gelose Columbia ANC + 5% de sangue de carneiro

Cor - Cortisol

COS - Gelose de Columbia + 5% de Sangue de Carneiro

CRP - Proteína C reativa

CT - Gelose de Contacto

CYFRA 21.1 - Antígeno formado por um fragmento da citoqueratina 19

DHEA - Dihidroepiandrosterona

EA - Antígeno precoce, do inglês *Early antigen*

EBNA - Antígeno nuclear, do inglês *EBV nuclear antigen*

EBV - Vírus de Epstein-Barr, do inglês *Epstein-Barr virus*

EDTA-K3 - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético Tripotássico

eE2 - Estradiol

EPO - Eritropoietina

ESP - Esfregaço de sangue periférico

FER - Ferritina

FSH - Hormona Folículo-Estimulante, do inglês *follicle stimulating hormone*

FT3 - Triiodotironina, fração livre

FT4 - Tiroxina, fração livre

G6PD - Glicose-6-fosfato-desidrogenase

GAS - Gastrina

GN - Caldo de Gram Negativo

GRH - Hormona de crescimento do inglês *Human growth hormone*

H2n - Proteína HER-2/neu

HCT - *Hematocrit*

HCY - Homocisteína

HE Agar - Gelose Hektoen Enteric Agar

HE4 - *Human epididymis protein 4*

HGB - *Hemoglobin*

HPT - Haptoglobina

HSV - Vírus *Herpes simplex*, do inglês *Herpes simplex virus*

IGF-I - Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I

IL-6 - Interleucina 6

INR - Razão internacional normalizada do inglês *International normalized ratio*

IPOCFG, E.P.E. - Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E.

IRMA - Ensaio imunorradiométrico, do inglês *Immunoradiometric Assay*

LCR - Líquido cefalorraquidiano

LDH - Lactato desidrogenase

LH - Hormona Luteinizante

LMA - Leucemia mieloide aguda

LMC - Leucemia mieloide crónica

MCHC - *Mean Globular Hemoglobin Concentration*

MCK - Gelose MacConkey

MCV - *Mean Blood Volume*

MGH - *Mean Globular Hemoglobin*

MH2 - Gelose Mueller Hinton 2

MHS - Gelose Mueller Hinton 2 + 5% de sangue de carneiro

MPV - *Mean Platelet Volume*

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à metilina

MYO - Mioglobina

NAD - Nicotinamida adenina dinucleótido

NMC - Neoplasia mieloproliferativa clonal

NRBC - *Nucleated Red Blood Cells*

NSE - Enolase Neuro Específica, do inglês *Neuron Specific Enolase*

NT-proBNP - Precursor peptídico natriurético tipo B n-terminal

OST - Osteocalcina

PEP.C - Peptídeo C

PLT - Platelets

PRL - Prolactina

PROG - Progesterona

PROGRP - Precursor do péptido libertador de gastrina

PROL - Prolactina

PSA Livre - Antígeno Específico da Próstata livre, do inglês *Prostatic Specific Antigen Free*

PSA Total - Antígeno Específico da Próstata, do inglês *Prostatic Specific Antigen Total*

PTH - Paratormona

PTT - Púrpura trombocitopenia trombótica

PVX - Gelose Chocolate PolyVitexX

RARS - Anemia refratária com sideroblastos em anel

RBC - *Red blood cells*

RDW - *Erythrocyte Dispersion Coefficient*

RF - Fator reumatoide

RIA - Radioimunoensaio, do inglês *Radio Imuno Assay*

RubG - Anticorpos Anti-Rubéola IgG

RubM - Anticorpos Anti-Rubéola IgM

SCC - Antígeno de Carcinoma das Células Escamosas, do inglês *Squamous Cell Carcinoma*

SCHEDK3 B-T - Caldo Schaedler + vit. K3

SCS - Gelose Schaedler + 5% de sangue de carneiro

SGC2 - Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol 2

SHBG - Globulina de ligação as hormonas sexuais, do inglês *Sex Hormone Binding Globulin*

Siphilis - *Treponema pallidum* screen (IgG e IgM)

SPCL - Serviço de Patologia Clínica Laboratorial

sTFR - Recetores solúveis da transferrina

T3 - Triiodotironina

T4 - Tiroxina

TE - Trombocitemia essencial

TG - Tiroglobulina

TNIH - Troponina de alta sensibilidade

ToxG - Anticorpos Anti-*Toxoplasma Gondii* IgG

ToxM - Anticorpos Anti-*Toxoplasma Gondii* IgM

TRF - Transferrina

TSA - Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

TSDT - Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica

TSH - Hormona Estimulante da Tiróide, do inglês *Thyroid-stimulating hormone*

TSI - Imunoglobulina Estimulante da Tiróide, do inglês *Thyroid stimulating immunoglobulin*

TST - Testosterona total

UI-F - Meio ureia indol

UWBC - *White blood cells*

VCA - Antígeno da cápside viral, do inglês viral *Capsid antigen*

VS - Velocidade de sedimentação eritrocitária

WBC - *Uncorrected white blood cells*

XLD - Gelose xilina lisina desoxicolato

I. INTRODUÇÃO

Os exames laboratoriais realizados num Laboratório de Análises Clínicas correspondem a uma parte imprescindível e fundamental na prevenção, rastreio, diagnóstico e monitorização da doença, bem como no auxílio ao tratamento.

O Mestrado em Análises Clínicas engloba um plano de estudos que pretende conferir uma aprendizagem multifacetada e especializada na área do diagnóstico laboratorial englobando as fases pré-analítica, analítica e pós-analítica. O mestrado contém também no seu plano de estudos um estágio curricular que visa consolidar todo o conhecimento adquirido no decorrer das suas unidades curriculares.

O presente relatório de estágio é relativo ao estágio realizado no Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, sob a orientação interna da Professora Doutora Ana Miguel Matos e orientação externa do Dr. Nuno Cunha, onde tive a oportunidade de integrar as quatro áreas pretendidas (Hematologia, Bioquímica, Microbiologia e Imunologia).

Este relatório abrange a componente prática e teórica das áreas de Microbiologia e Hematologia mais aprofundadamente contendo casos clínicos que foram surgindo ao longo do estágio, é ainda feita uma abordagem mais sucinta das áreas de Imunologia e Bioquímica, assim como do Controlo de Qualidade.

2. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO

O Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E. (IPOCFG, E.P.E.) é uma unidade hospitalar que integra a rede de prestação de cuidados de saúde do Serviço Nacional de Saúde e a plataforma de tipo A da rede de referência hospitalar de oncologia, o que lhe atribui responsabilidades de topo no diagnóstico e tratamento da doença oncológica em toda a Região Centro, com uma população estimada de dois milhões de habitantes.(1)

Realizei o estágio no Serviço de Patologia Clínica Laboratorial (SPCL) do IPOCFG onde os recursos humanos são compostos por pessoal qualificado, incluindo Médicos, Farmacêuticos, Técnicos Superiores de Saúde, Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica (TSDT), Administrativos, Assistentes Operacionais e Auxiliares. No SPCL do IPOCFG realiza-se o estudo dos parâmetros analíticos solicitados pelos diferentes serviços clínicos do hospital. Caso não se efetue um determinado parâmetro no SPCL, procede-se ao envio adequado da amostra para outra Instituição, como por exemplo o Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC).

O serviço é constituído por 4 setores fisicamente separados: Hematologia, Microbiologia, Química Clínica e Imunologia e Hormonologia e por várias áreas comuns.

O registo informático dos pedidos de análises é efetuado pelo clínico requisitante ou feito na secretaria, onde é atribuído a cada utente um número interno do serviço. Após a colheita ou receção dos produtos, estes são distribuídos o mais rapidamente possível pelos respetivos setores. Cada setor encontra-se equipado com os mais diversos recursos humanos e tecnológicos.

2.1. FASE PRÉ-ANALÍTICA

As colheitas de sangue são da exclusiva responsabilidade dos Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica do SPCL, tanto na sala de colheitas do SPCL como nas enfermarias. No caso de ser necessário outro tipo de amostras biológicas, as colheitas são realizadas pelo médico, pelo enfermeiro ou pelo próprio doente e transportados até ao serviço pelos Assistentes Operacionais.

2.2. FASE ANALÍTICA

A fase analítica engloba o processamento das diversas amostras, no entanto só será iniciada após as manutenções necessárias a cada equipamento e os respetivos controlos e calibrações.

Caso ocorra alguma alteração dos parâmetros analíticos devido ao estado da amostra, tais como a presença de agregados plaquetares, de hemólise ou a possibilidade de contaminação, será necessário efetuar nova colheita caso não seja possível assegurar a qualidade do resultado.

2.3. FASE PÓS-ANALÍTICA

A fase pós-analítica é constituída pela validação do resultado e envio do relatório após todos os parâmetros determinados estarem disponíveis no sistema informático, tendo em consideração o histórico clínico do doente.

Após a obtenção dos resultados, as amostras são armazenadas de forma que seja possível determinar a sua localização através do sistema informático que torna mais ágil a procura do tubo caso seja necessário repetir alguma análise.

3. CONTROLO DE QUALIDADE

O controlo de qualidade consiste num processo estatístico utilizado para avaliar e monitorizar a eficácia dos equipamentos na obtenção de resultados de qualidade e fiáveis.

O controlo de qualidade interno e o controlo de qualidade externo são essenciais e imprescindíveis na obtenção de resultados de qualidade e são regularmente utilizados em todos os setores do Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG.

3.1. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

O controlo de qualidade interno permite monitorizar e avaliar a precisão dos métodos utilizados.

Nos diversos setores realizam-se diariamente ensaios de controlo de qualidade interno recorrendo a amostras comerciais, para assegurar que os resultados obtidos refletem o que acontece *in vivo*.

Estes controlos são sempre efetuados no início do dia e sempre que necessário conforme a configuração e exigências das técnicas. A sua aceitação depende da análise das cartas de controlo de *Levey-Jennings* com base nas regras de *Westgard*. Considera-se que o método está sob controlo quando os valores obtidos se distribuem aleatoriamente em torno da linha da média, dentro dos limites de confiança (± 2 desvios padrão). Caso ocorra alguma alteração, tal como uma mudança de lote do reagente, será necessário efetuar a calibração dos parâmetros de forma a se poder garantir a qualidade dos resultados.

3.2. CONTROLO DE QUALIDADE EXTERNO

O controlo de qualidade externo tem como objetivo avaliar a exatidão dos métodos em relação aos laboratórios de referência e comparar o desempenho dos métodos utilizados no laboratório com os utilizados noutros laboratórios. Para isso, o grupo de laboratórios inscritos no programa de avaliação externa da qualidade analisa a mesma amostra de controlo de qualidade e os resultados obtidos são tratados estatisticamente por uma entidade externa e independente.

4. HEMATOLOGIA

A hematologia tem como objetivo o estudo da coagulação e das células sanguíneas. Assim torna-se possível efetuar o estudo das diversas doenças hematológicas, como a sua prevenção, origem, diagnóstico, evolução e avaliação da eficácia do tratamento.

O setor de hematologia do SPCL é altamente automatizado e diversos parâmetros analíticos são analisados através da utilização dos equipamentos descritos na Tabela I.

Tabela I: Equipamentos disponíveis no setor de Hematologia.

Equipamentos	Parâmetros analisados
<i>DxH900 Analyzer - Beckman Coulter</i>	Realização de hemograma
<i>TEST I BCL Alifax®</i>	Determinação da Velocidade de Sedimentação Globular
<i>ACL TOP® CTS500 - Instrumentation Laboratory</i>	Estudos da coagulação
<i>Aerospray Hematology Pro</i>	Coloração de esfregaços de sangue periférico e de aspirados de medula óssea
<i>3D FASCS CANTO II</i>	Estudo de imunofenotipagem por citometria de fluxo

4.1. COLHEITAS E AMOSTRAS

4.1.1. Sangue

Esta amostra é colhida, maioritariamente, para tubos contendo Ácido Etilenodiamino Tetraacético Tripotássico. (EDTA-K3). Este anticoagulante é um quelante de iões Ca^{2+} , estagnando assim a cascata da coagulação sanguínea e permitindo a realização de hemogramas e determinação da velocidade de sedimentação.

São também colhidas amostras para tubos com citrato de sódio 3,2%, um anticoagulante que, como o EDTA-K3, é um quelante de iões de Ca^{2+} . Nas amostras colhidas para estes tubos são realizados os testes de avaliação da homeostase.

4.1.2. Colheitas a quente

Estas colheitas são realizadas com material aquecido (caso seja necessário) e o tubo é transportado e mantido aquecido de forma a assegurar que este continua a uma temperatura similar com a *in vivo*.

Este género de colheita é necessário realizar devido à presença de aglutininas frias. Estes autoanticorpos policlonais ou monoclonais dirigidos contra os antígenos RBC i ou I ligam-se preferencialmente aos eritrócitos a temperaturas frias. São tipicamente um subtipo de imunoglobulina M que podem estar associados a distúrbios malignos (tal como: neoplasia de células B) ou distúrbios benignos (tal como: pós-infecção). Podem igualmente manifestar-se clinicamente como uma anemia hemolítica autoimune (2).

In vitro, caso não seja realizada uma colheita a quente nestes indivíduos, vai ocorrer aglutinação, o que resultará numa alteração dos valores dos parâmetros do hemograma. Para contrariar este evento o tubo é colocado na estufa a 37°C durante 10 minutos. Caso não ocorra resolução da situação é necessário realizar nova colheita, mas que será realizada a quente. Esta amostra é colhida para três tubos com anticoagulantes diferentes (EDTA, heparina e citrato de sódio), pois poderão estar presentes interferentes que afetem o anticoagulante.

Na Tabela 2 encontram-se os valores dos parâmetros dos hemogramas de um indivíduo em que foi necessário realizar uma colheita a quente e também foi colocada a primeira colheita na estufa a 37°C para averiguar se ocorrem alterações dos resultados dos parâmetros do hemograma.

Tabela 2: Resultados do hemograma de um indivíduo com aglutininas frias (Fonte SPCL IPOCFG, E.P.E.)

Parâmetros do Hemograma	Colheita normal	Colheita a quente	Estufa	Valores de referência	Unidades
RBC	2,90	3,73	3,75	4,0 – 5,5	10 ¹² /L
MCV	105,1	93,2	94,6	85,0 – 95,0	fL
MGH	41,1	31,3	31,6	27,0 – 32,0	pg
MGHC	39,1	33,6	33,4	32,0 – 36,0	g/dL

Como é possível observar pelos resultados obtidos por uma colheita normal, vai ocorrer aumento do volume globular médio, da hemoglobina globular média e da concentração da hemoglobina globular média, pois os eritrócitos estarão agregados e são identificados como sendo uma só célula com maiores dimensões e maior quantidade de hemoglobina. Enquanto nas amostras que permanecem a uma temperatura semelhante à *in vivo* apresentam valores dentro da normalidade.

4.2. ANÁLISES EFETUADAS

4.2.1. Hemograma

O hemograma é um exame laboratorial que auxilia o diagnóstico clínico e onde são avaliados os elementos celulares presentes no sangue, como é o caso dos eritrócitos, dos leucócitos e das plaquetas sanguíneas.

Através da obtenção dos diversos parâmetros, é possível averiguar a condição de saúde do indivíduo, avaliando por exemplo a presença de anemias ou de leucemias, bem como a eficácia do tratamento aplicado ao doente.

White blood cells e Uncorrected white blood cells

O *White blood cells* (WBC) representa a contagem de leucócitos e o *Uncorrected white blood cells* (UWBC) representa a contagem de glóbulos brancos não corrigidos. Estes dois parâmetros deverão estar em concordância, caso isso não aconteça significa que o equipamento está a reportar como leucócitos células que apresentam um volume semelhante aos mesmos, mas que não cumprem os critérios de condutividade e de dispersão da luz definidos no equipamento para serem classificadas como leucócitos. Esta diferença pode resultar da presença de agregados plaquetares.

Red blood cells

O *Red blood cells* (RBC) corresponde ao número de eritrócitos por unidade de volume de sangue.

Hemoglobin

O *Hemoglobin* (HGB) indica a quantidade de hemoglobina presente na amostra, expressa em g/dL.

Hematocrit

O *Hematocrit* (HCT) corresponde ao volume ocupado pelos eritrócitos em relação ao volume total de sangue, expresso em percentagem. Um valor reduzido do hematócrito é uma situação muito comum na anemia microcítica, enquanto um valor aumentado pode ser indicativo de Policitemia Vera.

Mean Blood Volume

O *Mean Blood Volume* (MCV) indica o volume médio dos eritrócitos, sendo importante na classificação das anemias em microcítica, normocítica ou macrocítica, expresso em fL.

Mean Globular Hemoglobin

O *Mean Globular Hemoglobin* (MGH) indica o valor médio de hemoglobina por eritrócito, expresso em pg. Este parâmetro em conjunto com MCHC permitem distinguir as anemias em hipocrômicas, normocrômicas e hiperocrômicas.

Mean Globular Hemoglobin Concentration

A *Mean Globular Hemoglobin Concentration* (MGHC) corresponde à concentração média de hemoglobina num determinado hematócrito, expresso em g/dL.

Erythrocyte Dispersion Coefficient

O *Erythrocyte Dispersion Coefficient* (RDW) indica o grau de anisocitose eritrocitária, ou seja, representa a percentagem de variação do volume dos eritrócitos. Na presença de uma anemia ocorre alteração deste valor. No caso de uma anemia ferripriva, o RDW encontra-se aumentado, ou seja, existe uma população heterogênea de eritrócitos, no entanto com agravamento da anemia este valor retorna ao normal, pois toda a população de eritrócitos será homogênea, porém mais pequena do que a referência.

Platelets

O *Platelets* (PLT) indica a contagem total de plaquetas presentes na amostra.

Mean Platelet Volume

O *Mean Platelet Volume* (MPV) é uma medida do tamanho médio das plaquetas, expresso em fL.

Contagem diferencial de Leucócitos

É efetuada a contagem absoluta dos Neutrófilos, Linfócitos, Monócitos, Eosinófilos e Basófilos. Posteriormente é feita a percentagem de cada tipo de leucócito relativamente ao seu total. É muito importante observar principalmente o valor absoluto para se poder retirar conclusões.

Nucleated Red Blood Cells (NRBC)

Os *Nucleated Red Blood Cells* (NRBC) têm tamanho e núcleo semelhantes aos dos linfócitos. Como resultado, muitos equipamentos classificam erradamente os NRBC, o que origina uma contagem total de leucócitos (WBC) e linfócitos incorreta.

4.2.2. Esfregaço de sangue periférico

No setor de Hematologia é efetuada a realização de esfregaços de sangue periférico (ESP), que são posteriormente corados pela coloração de Wright e observados ao microscópio ótico. Este é realizado quando é solicitado pelo clínico ou quando ocorre a alteração nos parâmetros do hemograma que sugira alguma alteração e seja necessário a visualização do ESP.

O ESP para análise microscópica, é feito com duas lâminas: a lâmina onde será feita a análise e uma lâmina que promoverá a extensão do sangue conforme a Figura 1 (3).

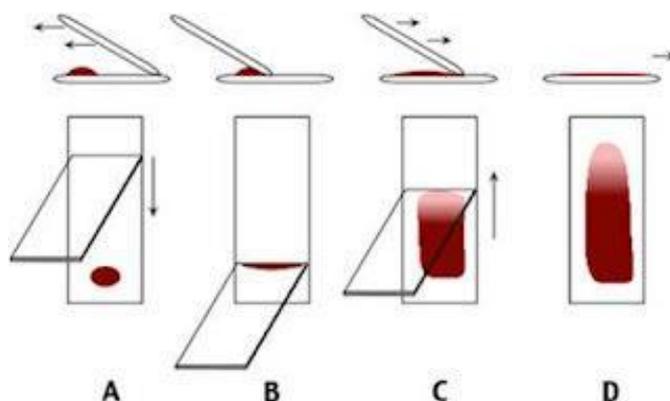


Figura 1: Esquema da realização de um esfregaço de sangue periférico. A: Gotas de sangue na extremidade da lâmina, com a lâmina que promoverá o esfregaço inclina-se a 45 graus, recua-se (B) e promove-se a extensão (C, D). O esfregaço ideal deve ter bordas laterais livres e um fim em forma de semicírculo (3).

A Coloração de Wright utiliza corantes básicos, tais como tiazina e corantes ácidos, tais como eosina. Os núcleos e outras estruturas no sangue que são coradas pelos corantes básicos são denominados de basofílicos. Estruturas que absorvem apenas corantes ácidos são chamadas de acidófilas, ou eosinofílicas. Outras estruturas coradas por uma combinação dos dois são chamadas de neutrofílicas (4).

Para a observação ao microscópio é primeiramente utilizada a objetiva de 40x para se determinar a melhor zona de observação do ESP onde os eritrócitos se encontrem igualmente distribuídos e posteriormente é utilizada a objetiva de 50x para a observação das características morfológicas das diferentes células sanguíneas normais e alteradas, assim como a presença de células anômalas ao sangue periférico.

Série vermelha

Num ESP é possível observar as diversas alterações que podem ocorrer nos eritrócitos, como no seu tamanho (anisocitose), na sua forma (poiquilositose) e na sua coloração (anisocromia). Também é possível observar células imaturas, tais como eritroblastos e reticulócitos.

Tabela 3: Variações mais frequentes no tamanho dos eritrócitos (anisocitose) que podem ser observados e algumas causas (5).

Alterações Eritrocitárias	Imagem	Causas
Microcitose (Diminuição do tamanho)		Anemia ferripriva Hemoglobinopatias
Macrocitose (Aumento do tamanho)		Hepatopatia Quimioterapia

Tabela 4: Algumas das variações mais frequentes na forma dos eritrócitos (poiquilocitose) que podem ser observados e algumas causas (5).

Anomalias Eritrocitárias	Imagem	Causas
Microesferócito		Esferocitose hereditária Anemia hemolítica autoimune Septicémia
Células em alvo		Deficiência de ferro Hepatopatia Hemoglobinopatia Pós-esplenectomia
Estomatócito		Hepatopatia Alcoolismo
Células em lápis		Deficiência de ferro

Equinócitos		Hepatopatia Pós-esplenectomia Artefacto de conservação
Acantócitos		Hepatopatia Insuficiência renal
Fragmentos		Síndrome-hemolítico-urémica Queimaduras
Eliptócito		Eliptocitose hereditária
Pecilócito em lágrima		Mielofibrose Hematopoese extramedular
Célula em cesto		Dano oxidativo (ex: deficiência de G6PD, hemoglobina instável)
Célula falciforme		Anemia de células falciformes

Série branca

Se no resultado do hemograma aparecer alterado o valor de algum dos leucócitos, pode ser efetuado um ESP para avaliar esse resultado. É também observado se os leucócitos apresentam alguma alteração.

Tabela 5: Algumas causas da alteração da quantidade de leucócitos (6).

Célula	Alteração	Causas
Neutrófilo	Neutrofilia	Infeções bacterianas Doenças metabólicas Neoplasias de todos os tipos (ex: carcinoma, linfoma, melanoma) Hemorragia ou Hemólise aguda Leucemia mieloide crônica, neoplasias mieloproliferativas, policitemia vera, mielofibrose, trombocitemia essencial
	Neutropenia	Fármacos (ex: anti-inflamatórios, quimioterapia, antibioterapia) Lúpus eritematoso sistêmico Leucemia de linfócitos grandes e granulares Infeção bacteriana fulminante

Monócito	Monocitose	Infeção bacteriana crónica (ex: Tuberculose) Doenças dos tecidos conectivos (ex: Lúpus eritematoso sistêmico) Linfoma de Hodgkin, LMA e outras neoplasias malignas Leucemia mielomonocítica crónica
Eosinófilo	Eosinofilia	Doença alérgica Doença parasitária (ex: ascaridíase) Certas doenças da pele (ex: psoríase) Linfoma de Hodgkin Tumores metastáticos com necrose tumoral
Linfócito	Linfocitose	Infeções agudas (ex: mononucleose infecciosa) Infeções crónicas (ex: tuberculose) Leucemia linfóide crónica Linfoma não Hodgkin
Basófilo	Basofilia	Neoplasia mieloproliferativa (ex: LMC)

Plaquetas

No ESP é possível observar a morfologia e o tamanho das plaquetas presentes na amostra. É possível também averiguar a qualidade da amostra, pois caso o hemograma indique que existe uma trombocitopenia com plaquetas gigantes, através do ESP é possível determinar se esta situação é real ou se existem agregados plaquetares devido a colheita da amostra.

Tabela 6: Algumas causas da alteração da quantidade de plaquetas (7).

Alteração	Causa
Trombocitopenia	Insuficiência na produção de plaquetas Depressão seletiva de megacariócitos (ex: fármacos) Insuficiência global da medula (ex: radioterapia, mielofibrose, leucemia)
Trombocitose	Reacionais: Hemorragia, traumatismo, pós-operatório Deficiência crónica de ferro Tumores malignos Endógenas: Trombocitemia essencial (mutação JAK2 + ou -) Alguns casos de policitemia vera, mielofibrose primária, leucemia mieloide crónica, BCR-ABL1+ e mielodisplasia (5q- ou anemia refratária com sideroblastos em anel)

4.2.3. Velocidade de sedimentação eritrocitária

A velocidade de sedimentação eritrocitária (VS) mede a taxa na qual os eritrócitos numa amostra de sangue total sedimentam no fundo do tubo (8).

Os eritrócitos geralmente sedimentam a um ritmo mais rápido em pessoas com condições inflamatórias, tais como infecções ou condições autoimunes. Essas condições levam a um aumento no número de proteínas no sangue o que origina uma aglomeração dos eritrócitos (rouleaux), que sedimentam mais rapidamente (8).

Normalmente, os eritrócitos têm cargas negativas do lado de fora das células, o que origina uma repulsão. Muitas proteínas plasmáticas têm cargas positivas e podem efetivamente neutralizar as cargas negativas da superfície dos eritrócitos, o que permite a formação dos rouleaux. Portanto, um aumento nas proteínas plasmáticas levará a um aumento na formação de rouleaux, que se depositam mais rapidamente do que os eritrócitos isolados o que levará a um aumento da VS (8).

O valor estabelecido para a VS é que esta seja inferior ou igual a 20 mm/h. No entanto, muitas doenças inflamatórias aumentam a VS, ou seja, diminuem o tempo que os eritrócitos demoram a sedimentar, por outro lado outras condições podem diminuir a VS, ou seja, aumentar o tempo que os eritrócitos demoram a sedimentar. Como exemplo a Policitemia (aumentado número de eritrócitos) aumentará a viscosidade do sangue e pode causar uma VS reduzida (reduz a taxa na qual o rouleaux de eritrócitos se depositará no fundo do tubo) (8).

4.2.4. Homeostase

A resposta normal ao dano vascular depende da interação entre a parede vascular, as plaquetas circulantes e os fatores de coagulação sanguíneos.

Um mecanismo eficiente e rápido para estagnar a hemorragia em locais de lesão vascular é essencial à sobrevivência. No entanto, essa resposta precisa ser estritamente controlada para evitar o desenvolvimento de coágulos extensos e os desfazer após a reparação do dano. Desse modo, o sistema hemostático é um equilíbrio entre mecanismos pró-coagulantes e anticoagulantes, aliado a um processo de fibrinólise. Os cinco principais componentes envolvidos são plaquetas, fatores de coagulação, inibidores da coagulação, fatores fibrinolíticos e vasos sanguíneos (9).

É essencial efetuar um conjunto de testes para fazer uma avaliação global da homeostase e é necessário conhecer a clínica do utente para determinar a existência de fatores que possam alterar o valor dos testes de coagulação, tais como a administração de anticoagulante ou o défice na síntese de proteínas pelo fígado.

O estudo da hemóstase é efetuado através da realização dos testes da coagulação que fornecem uma avaliação dos sistemas da via extrínseca e da via intrínseca da coagulação, bem como da conversão do fibrinogénio em fibrina.

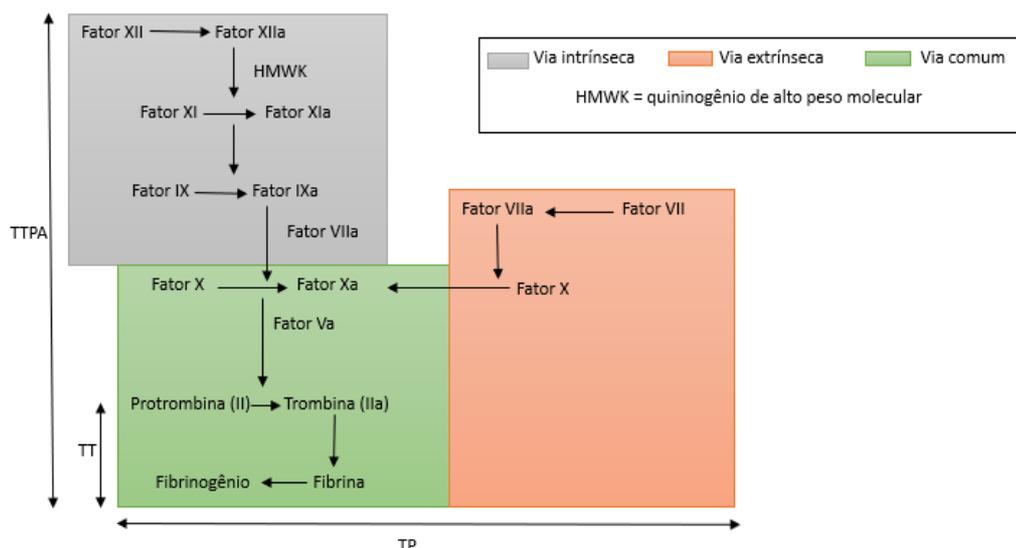


Figura 2: Esquema ilustrativo da cascata da coagulação sanguínea onde é possível observar as vias intrínsecas (contacto), extrínseca e comum. O TTPA testa as vias intrínsecas e comum, o TP testa as vias extrínsecas e comum e o TT testa inibidores da trombina e deficiência do fibrinogênio (10).

Tempo de Protrombina

O Tempo de Protrombina (TP) avalia os fatores VII, X, V, protrombina (II) e fibrinogênio. Para a realização deste teste são adicionados tromboplastina tecidual (um extrato cerebral) ou fator tecidual (sintético) com lípidos e cálcio ao plasma citratado. O tempo normal para a coagulação é de 10 a 14 segundos (11).

Com o objetivo de uniformizar os resultados obtidos entre diferentes laboratórios, a Organização Mundial de Saúde indicou o uso do *Internacional Normalized Ratio*.

$$\text{INR} = (\text{TP doente} / \text{TP controle})^{\text{ISI}}$$

- ISI – índice de sensibilidade internacional

Tempo de tromboplastina parcial ativada

O Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) avalia os fatores VIII, IX, XI, XII, X, V, protrombina (II) e fibrinogênio. Para a realização deste teste são adicionadas três substâncias ao plasma citratado, os fosfolípidos, um ativador de superfície e o cálcio. O tempo normal para a coagulação é de 30 a 40 segundos (11).

O aumento do TP e do TTPA causado pela deficiência de um fator da coagulação, pode corrigido pela adição de plasma normal (Teste de mistura). Se não houver correção, ou se a correção com plasma for incompleta, suspeita-se da presença de inibidor da coagulação (11).

Tempo de Trombina

O Tempo de Trombina (TT) é essencial para avaliar a deficiência de fibrinogénio ou a inibição da trombina. Para a realização deste teste é adicionada trombina bovina diluída ao plasma citratado em concentrações que produzam um tempo de coagulação de 14 a 16 segundos em plasma normais (11).

Doseamento do fibrinogénio

O fibrinogénio é o componente terminal da cascata da coagulação sanguínea e a sua concentração adequada é fundamental para manutenção da homeostase.

O fibrinogénio é tipicamente medido por ensaios de coagulação funcional, mas pode ser medido por métodos imunoturbidimétricos ou por métodos turbidimétricos. As concentrações plasmáticas de fibrinogénio são normalmente de 150 a 350 mg/dL, mas variam ligeiramente com o método de análise (12).

Anticoagulante Lúpico – autoanticorpo

Síndrome do anticorpo antifosfolípido é uma doença autoimune na qual os indivíduos têm autoanticorpos contra as proteínas ligadas aos fosfolípidos que podem originar trombos venosos ou arteriais. Inicialmente foi reconhecido nos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, no entanto este síndrome pode ser observado de forma isolada (13).

Os resultados dos testes de coagulação podem se encontrar aumentados devido à presença destes autoanticorpos que interferem com os fosfolípidos do reagente. Assim suspeita-se da existência de anticoagulante lúpico se o TTPA estiver aumentado e não for corrigido através do teste da mistura (13).

4.3. CASOS CLÍNICOS

4.3.1. Caso Clínico 1

Doente de 72 anos, sexo masculino com diagnóstico de Trombocitemia essencial (TE) desde 2005. Esta patologia é caracterizada por trombocitose periférica persistente, aumento de megacariócitos na medula óssea, esplenomegalia e risco de complicações trombóticas e/ou hemorrágicas. A TE é uma neoplasia mieloproliferativa clonal (NMC) BCR-ABL1-negativa que possui um prognóstico mais favorável do que outras NMC devido à diminuição da incidência de trombose e menos transformação leucémica (14).

Mais de metade das pessoas com TE tem uma mutação genética chamada JAK2. Outras mutações comuns afetam o gene *CALR* ou *MPL* (15) Este doente possui a mutação JAK2V617F+ descoberta em outubro de 2016 e faz tratamento com Hidroxiureia desde o diagnóstico. Este fármaco tem como mecanismo de ação mais importante a inibição da ribonucleotídeo redutase, a enzima envolvida na transformação de ribonucleosídeos em desoxirribonucleosídeos, impedindo assim a síntese de ADN (16).

O doente dirigiu-se ao Serviço de Patologia Clínica Laboratorial para efetuar análises de rotina para monitorização da sua patologia (Tabela 7).

Tabela 7: Resultados das análises laboratoriais Caso clínico I. (Fonte SPCL IPOCFG, E.P.E.).

Parâmetros	Resultados	Valores de referência	Unidades
Leucócitos	4,9	4,0 – 11,0	10 ³ /μL
Neutrófilos	2,6 (53,0%)	1,8 – 7,0	10 ³ /μL
Linfócitos	0,5 (10,0%)	1,0 – 5,0	10 ³ /μL
Monócitos	0,4 (8,0%)	0,1 – 1,2	10 ³ /μL
Eosinófilos	0,0 (1,0%)	0,0 – 0,6	10 ³ /μL
Basófilos	0,0 (0,0%)	0,0 – 0,2	10 ³ /μL
Blastos	1,37	-	10 ⁹ /L
Eritroblastos	1,0	-	-
Eritrócitos	2,8	4,5 – 6,5	10 ¹² /L
Hemoglobina	8,4	13,0 – 18,0	g/dL
Hematócrito	24,8	40,0 – 54,0	%
VCM	88,3	58,0 – 95,0	fL
HCM	29,8	27,0 – 32,0	pg
CHCM	33,8	32,0 – 36,0	g/dL
RDW	15,7	11,5 – 14,5	%
Plaquetas	51	140 - 400	10 ³ /μL
Plaquetócrito	0,039	0,160 – 0,350	%
PDW	18,0	9,8 – 16,1	fL
VPM	7,8	9,4 – 12,6	fL

Observação do esfregaço de sangue periférico

Foi realizado um ESP onde foi observada a morfologia das diversas células sanguíneas. Observou-se neutrófilos com morfologia atípica; policromasia eritrocitária com eliptócitos e esquizócitos; anisocitose plaquetar com hipogranulação. Também se observaram blasto ovais com nucléolo grande e proeminente, e granulação basófila citoplasmática.

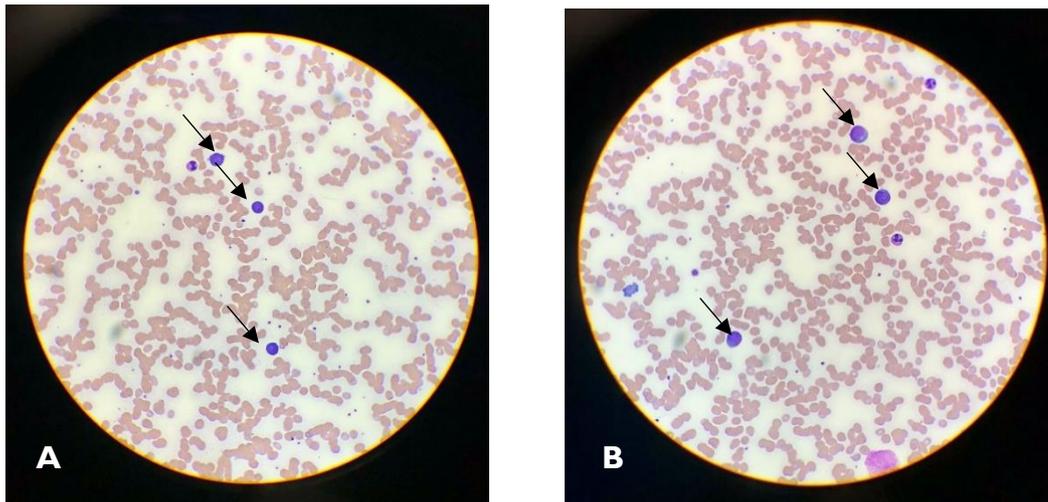


Figura 3: Imagens microscópicas do esfregaço de sangue periférico do doente onde é possível observar a presença de Blastos. (Fonte SPCL IPOCFG).

Nota: Tendo em conta as dificuldades na identificação da linhagem das células blásticas optou-se pela realização de um estudo de imunofenotipagem para caracterização e confirmação da mesma.

Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Amostra com duas subpopulações de células blásticas que perfazem cerca de 72 a 74% da celularidade total, sugestiva de Leucemia Mieloblástica Aguda.

Conclusão

Através dos resultados laboratoriais obtidos e da observação do ESP podemos concluir que este doente se encontra com uma Leucemia Mieloblástica Aguda.

Através dos resultados laboratoriais obtidos e da observação do ESP podemos concluir que este doente apresenta uma Leucemia Mieloblástica Aguda.

A transformação da TE em leucemia aguda é um evento raro e pode ser espontânea ou relacionada à terapia. As mais frequentemente associadas são as leucemias mieloblásticas ou mielomonoblásticas (14).

As terapêuticas que podem resultar numa alta incidência de transformação de TE em leucemia incluem: Busulfan, P32, Clorambucil, Anagrelida e Hidroxiureia. No caso da Hidroxiureia, a existência e magnitude de um aumento do risco de desenvolver leucemia permanece um assunto de debate (14).

O risco de transformação é muito baixo, de 0,7% a 9,3% na primeira década do diagnóstico (14).

4.3.2. Caso Clínico 2

Doente de 75 anos, com anemia macrocítica em agravamento pelo menos desde 2011. Fez suplementação com ácido fólico e vitamina B12 em 2018 sem efeito. Apresentou cansaço para médios esforços, perda de apetite, sem perda acentuada de peso, sem palpitações, sem hipersudorese noturna, sem febre e sem clínica de hemólise. Não tem história oncológica e sem história familiar de anemia.

Foi encaminhada para o IPOCFG devido a macrocitose prolongada e dirigiu-se ao Serviço de Patologia Clínica Laboratorial para a realização de análises laboratoriais prévias à consulta de hematologia (Tabela 8).

Tabela 8: Resultados das análises laboratoriais Caso clínico 2. (Fonte SPCL IPOCFG, E.P.E.).

Parâmetros	Resultados	Valores de referência	Unidades
Leucócitos	6,3	4,0 – 11,0	10 ³ /μL
Neutrófilos	3,4 (54,0%)	1,8 – 7,0	10 ³ /μL
Linfócitos	1,9 (30,0%)	1,0 – 5,0	10 ³ /μL
Monócitos	0,6 (10,0%)	0,1 – 1,2	10 ³ /μL
Eosinófilos	0,3 (5,0%)	0,0 – 0,6	10 ³ /μL
Basófilos	0,1 (1,0%)	0,0 – 0,2	10 ³ /μL
Eritroblastos	81,0	-	-
Eritrócitos	2,41	4,0 – 5,5	10 ¹² /L
Hemoglobina	8,5	12,0 – 16,0	g/dL
Hematócrito	25,8	35,0 – 47,0	%
VCM	107,1	85,0 – 95,0	fL
HCM	35,3	27,0 – 32,0	pg
CHCM	32,9	32,0 – 36,0	g/dL
RDW	14,4	11,5 – 14,5	%
Plaquetas	260	140 - 400	10 ³ /μL
Plaquetócrito	0,274	0,160 – 0,350	%
PDW	17,7	9,8 – 16,1	fL
VPM	10,5	9,4 – 12,6	fL
Reticulócitos	0,03(1,14%)	0,5 – 1,5	10 ⁶ /μL
Eritropoietina	84,8	4,3 – 29,0	mUI/mL

Ácido fólico	5,4	3,9 – 26,8	ng/mL
Vitamina B12	1140,0	191,0 – 663,0	pg/mL
Ferritina	91,5	10,0 – 291,0	µg/L
Haptoglobina	74,3	30,0 – 200,0	mg/dL

Observação do Esfregaço de sangue periférico

Foi efetuada a realização de um ESP onde foi observada a morfologia dos eritrócitos, em que estes apresentavam macrocitose e policromasia com ovalócitos e células em lágrima.

Observação do Medulograma:

Megacariócitos: Cerca de 12% dos megacariócitos apresentavam alterações a registar, nomeadamente tamanho pequeno, mononucleados, binucleados podendo apresentar os núcleos em polos opostos da célula.

Série mielóide: Cerca 7% das células da linha mielóide consistem em neutrófilos e eosinófilos por vezes com núcleo em “borboleta”, anofilia (reagem tanto com corantes ácidos como básicos) e hipogranulação.

Série eritróide: Cerca de 27% das células nucleadas apresentava, defeitos grosseiros de hemoglobinização (formação ou concentração de hemoglobina). Observaram-se também frequentes pontes intercitoplasmáticas (mais do que é habitual observar) e algumas formas em divisão.

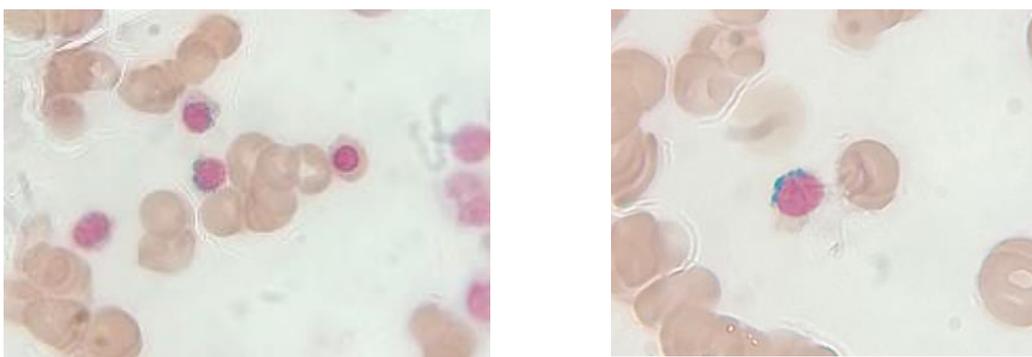


Figura 4: Imagem microscópica do esfregaço de medula da doente corado com a coloração de Perls, onde é possível observar eritroblastos com sideroblastos em anel. (Fonte SPCL IPOCFG, E.P.E.).

Coloração de Perls:

Depósitos de ferro no fragmento presentes e diminuídos.

Depósitos de ferro no eritrão: 44% de sideroblastos em anel e 28% de eritroblastos com múltiplos grânulos dispersos no citoplasma.

Conclusão

Através dos resultados laboratoriais obtidos e da observação do esfregaço de medula podemos concluir que este doente apresenta uma anemia refratária com sideroblastos em anel (RARS).

A anemia sideroblástica trata-se de uma anemia refratária definida pela presença de muitos sideroblastos patológicos (sideroblastos em anel) na medula óssea. Esses eritroblastos anormais contêm numerosos grânulos de ferro, dispostos em anel, ou colar em torno do núcleo, em vez de os poucos grânulos de ferro distribuídos aleatoriamente observados nos eritroblastos normais corados para ferro. Há, também, hiperplasia eritróide com eritropoese ineficaz (17).

A anemia sideroblástica é diagnosticada quando 15% ou mais dos eritroblastos da medula são em anel. A anemia refratária com sideroblastos em anel é um tipo de mielodisplasia e é a forma primária adquirida de anemia sideroblástica (17).

Esta patologia tem como prognóstico uma sobrevida média geral de aproximadamente 6 anos e cerca de 1-2% dos casos de RARS com displasia unilinhagem evoluem para leucemia mielóide aguda (18).

5. BIOQUÍMICA

O setor de bioquímica tem como objetivo a determinação de diversos parâmetros bioquímicos que proporcionam uma informação de extrema importância no auxílio ao diagnóstico e na monitorização da terapêutica e da progressão da doença.

Neste setor, as amostras maioritariamente processadas são o soro, a urina e o sangue total para avaliação do cálcio ionizado e da hemoglobina glicada, porém são analisados outros fluidos corporais como o líquido cefalorraquidiano (LCR), líquido ascítico e líquido pleural.

O soro é a amostra onde são determinados a maioria dos parâmetros bioquímicos. É importante avaliar a qualidade da amostra, pois fatores como hemólise, lipémia e icterícia podem interferir nos resultados obtidos. Caso estes sejam observados, pode ser necessário requerer nova colheita de amostra, se se averigua que estas interferem na qualidade dos resultados para os parâmetros requeridos. No caso de uma amostra hemolisada ocorre libertação do conteúdo intracelular para o meio exterior e, conseqüentemente, alteração de alguns parâmetros bioquímicos que irão ser doseados no soro. Dois dos parâmetros, cujo correto doseamento pode ser influenciado por este fator são o Potássio (K^+) e a Lactato desidrogenase (LDH).

Este setor colabora na realização de ensaios clínicos pela preparação da amostra (como: soro, plasma, sangue total e urina pontualmente), segundo protocolos previamente enviados e programados.

A extrema automatização deste setor proporciona uma maior rapidez na obtenção dos resultados e diminui a ocorrência de erros humanos. Porém são também efetuadas técnicas manuais utilizando testes de aglutinação para detecção no soro de parâmetros que variam consoante o teste, como a determinação qualitativa de fatores reumatoides.

Tabela 9: Equipamentos disponíveis no setor de Bioquímica.

Equipamentos	Testes Executados
Atellica® CH Solution da SIEMENS Healthineers	Doseamento de diversos parâmetros bioquímicos
ABL 800 FLEX da Radiometer®	Doseamento do cálcio ionizado e gasometria
Viva-E da SIEMENS	Utilizado para o doseamento de drogas/fármacos
Rapidchem™ 744 da SIEMENS	Ionograma, utilizado para a confirmação dos resultados de Na ⁺ , K ⁺ e Cl ⁻
Reflotron® Plus da Roche® Diagnostics	Utilizado para a confirmação de resultados de alguns parâmetros da Atellica® Solution da SIEMENS Healthineers (química seca)

6. IMUNOLOGIA E HORMONOLOGIA

No SPCL do IPOCFG as áreas de Imunologia e de Hormonologia encontram-se combinadas num único setor que tem como responsável o Doutor Nuno Alexandre Costa Ferreira da Cunha, Técnico Superior de Saúde de laboratório, especialista em Análises Clínicas pela Ordem dos Biólogos.

Neste setor são doseados no soro uma série de parâmetros de extrema relevância para a avaliação e acompanhamento terapêutico dos doentes oncológicos, tais como: marcadores tumorais, biomarcadores inflamatórios, hormonas e marcadores cardíacos. Também se procede ao estudo da função hormonal no diagnóstico diferencial das patologias endocrinológicas. Alguns parâmetros como: Troponina I de elevada sensibilidade, Metanefrinas plasmáticas, Renina, Aldosterona, PTH e ACTH são doseados em plasma, após centrifugação de sangue total em EDTA K3 ou Heparina de lítio.

Alguns parâmetros são doseados na urina 24h de acordo com algumas condicionantes pré-analíticas e em conformidade com os analitos de interesse: contentor opaco (proteger a urina da luz) para o doseamento de cortisol livre urinário, ou contentor com ácido clorídrico 6N (preservar a amostra) para o doseamento de ácido 5-hidroxiindolacético, ácido vanilmandélico, ácido homovanílico e metanefrinas fracionadas. A urina de 24h sem tratamento também permite a pesquisa da proteína de Bence Jones. O cortisol livre também pode ser determinado na saliva.

O doseamento ou a pesquisa de alguns parâmetros procede-se em alguns casos de uma forma semi-automática, ou seja, o procedimento de pipetagem e o tratamento das amostras é manual e depois recorre-se aos equipamentos para a separação eletroforética, coloração, fixação e leitura final, como a eletroforese de proteínas (proteínograma), eletroforese de hemoglobinas, imunofixação de proteínas séricas e urinárias. Algumas técnicas como o radioimunoensaio (RIA e IRMA), apenas o passo de leitura final é que é automatizado.

Este setor encontra-se extremamente automatizado o que proporciona uma maior eficiência para a determinação de resultados e diminuição do erro humano.

Tabela 10: Equipamentos disponíveis no setor de Imunologia e Hormonologia.

Equipamentos	Técnicas utilizadas	Parâmetros
Immulate® 2000 XPi da Siemens™	Imunoensaios de quimioluminescência	EPN, GRH, IGF-I, TSI, GAS, ATA, BMG, CEA
ADVIA Centaur® XPT da Siemens	Imunoensaios de quimioluminescência	ANDRO, CK-MB, Ee2, FER, FSH, H2n, LH, MYO, PRL, PSA, PTH, RubG, RubM, SHBG, TNIH, ToxG, ToxM, TSH, TST, Vitamina D total, FSH, NT-proBNP
Kryptor® da B·R·A·H·M·STM	Imunoensaios de fluorescência por <i>Time-Resolved Amplified Cryptate Emission</i>	CA 15-3, NSE, PCT, CGA, SCC, PROL
Cobas e601 Analyser® da Roche® Diagnostics	Imunoensaios de eletroquimioluminescência	ACTH, ATG, Cortisol, Calcitonina, DHEA, FT3, FT4, T3, T4, ATSHR, TG, PEP.C, Insulina, HE4, PRO-GRP, CA 125, CYFRA 21.1, S100, Syphilis, IL-6 OST
Cobas e801 Analyser® da Roche® Diagnostics	Imunoensaios de eletroquimioluminescência	Vitamina B12, CA 19-9, CA 72-4, Ácido Fólico, β-HCG, Progesterona, AFP
Atellica NEPH 630 da Siemens	Imunoensaios por nefelometria	FR, C4, C3c, AAG, CRP, IgG, IgA, IgM, AAT, TRF, sTfR, HPT, HCY, ASLn

IDS-iSYS Multi-Discipline Automated System	Imunoensaios por <i>Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique</i>	1,25-dihidroxitamina D, HSV1-IgG, HSV2-IgG, HSV1/2-IgM, EBV VCA-IgG e IgM, EBV EA-IgG, EVB EBNA-IgG, Testosterona livre, Aldosterona, Renina
Optilite® da Binding Site	Imunoensaios por turbidimetria	Cadeias Kappa leve livre, Cadeias Lambda leve livre, IgA-Kappa, IgA-lambda, IgG-Kappa, IgG-lambda, IgD
Hydrasys® da Sebia®	Analizador multifuncional para eletroforese em gel	Proteinograma, Imuno-fixação, Eletroforese de hemoglobinas
Phadia 200 da Thermo Fisher SCIENTIFIC	Imunoensaios de ELISA	Deteção de alergias e doenças autoimunes
Analyzer I-2P da EUROIMMUN	Imunoensaios de ELISA automatizados	ácido 5-hidroxiindolacético, Iodo urinário
IF Sprinter da EUROIMMUN	Ensaio de imunofluorescência automatizados	Autoimunidade
EUROBlotOne da EUROIMMUN	Ensaio de Immunoblots	Autoimunidade
Wallac Wizard 1470 gamma counters da GMI	Detetor com recurso a radioisótopos (RIA)	Metanefrinas e Normetanefrinas
Elisa reader da DiaSource ImmunoAssays	Leitor de placas de Elisa	-

7. MICROBIOLOGIA

A microbiologia proporciona informação indispensável para o diagnóstico da doença infecciosa e da determinação da suscetibilidade do(s) respetivo(s) agente(s) patogénico(s) aos antimicrobianos.

No setor de microbiologia do SPCL são recebidos diversos produtos biológicos de diferentes serviços da instituição. O estudo microbiológico é realizado em quatro vertentes: bacteriológico, micológico, parasitológico e micobacteriológico, tendo em conta a requisição efetuada pelo clínico. Este estudo é condicionado pelas condições da amostra, nomeadamente a sua natureza, acondicionamento, preservação e transporte. Antes do processamento das amostras, é fundamental que a colheita seja efetuada corretamente tendo em conta o local anatómico e o microrganismo suspeito. Idealmente deve ser realizada antes da administração de antibioterapia e deve ser enviada o mais rapidamente possível para ser processada.

Na receção da amostra, é imperativo verificar a sua correta identificação e se o contentor de transporte é o adequado para o acondicionamento e processamento requerido (como exemplo: deve ser utilizado o frasco Portagerme™ como meio de transporte na suspeita de bactérias anaeróbias), bem como a sua integridade. Caso não tenham sido cumpridas as condições de colheita e transporte, a amostra é rejeitada, exceto em situações, que apesar das condições incorretas, o processamento da amostra seja benéfico para o doente, sendo este aspeto referido no resultado.

Os procedimentos para o processamento das amostras, apesar de serem adaptados para cada produto biológico e para o estudo microbiológico requisitado pelo clínico apresentam uma estrutura comum. Primeiramente, é efetuada uma avaliação macroscópica da amostra e, caso seja necessário, é realizada uma preparação da mesma. Seguidamente, consoante o estudo a efetuar, realiza-se o exame cultural semeando a amostra nos meios de cultura considerados mais adequados. Após a obtenção de uma cultura pura dos microrganismos considerados clinicamente relevantes, procede-se à identificação definitiva dos mesmos e à realização dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA).

No entanto, a identificação também poderá ser realizada diretamente a partir da amostra utilizando metodologias mais recentes, como a biologia molecular.

Após a obtenção de resultados, os mesmos são inseridos no sistema informático e validados tendo em consideração o histórico do doente e uma comunicação estreita com o clínico.

Devido ao método do processamento dos diversos produtos biológicos, este setor é o que mais depende do trabalho manual realizado pelos TSDT. No entanto, o setor dispõe de equipamentos que auxiliam na realização do estudo microbiológico (Tabela II).

Este setor colabora no estudo microbiológico de alguns produtos e/ou equipamentos de alguns serviços da instituição, tais como: superfícies, broncofibroscópios e endoscópios, soluções terapêuticas e derivados de sangue.

Também colabora em redes de vigilância epidemiológica a nível nacional, reportando estirpes de notificação obrigatória para o SINAVE e contribuindo com estirpes para estudos que são enviadas para o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA).

Além disso, colabora como o Grupo de Coordenação Local de Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos antimicrobianos (GCL-PPCIRA), fornecendo a informação sobre resistências locais e indicando quais os doentes com necessidade de implementar medidas de isolamento.

Tabela 11: Equipamentos disponíveis no setor Microbiologia.

Equipamentos	Técnica e Testes Executados
BD BACTEC™ 9000 Blood Culture System BD da Becton Dickinson	Sistema automatizado de incubação de amostras de sangue e líquidos biológicos, colhidos em frascos de cultura BD BACTEC, que possuem um sensor que emite fluorescência quando há produção de CO ₂ , associada ao crescimento microbiano. (19)
Accelerate Pheno® system	Sistema automatizado para identificação rápida e realização de TSA de hemoculturas positivas utilizando a tecnologia de FISH e análise celular morfocinética.
Vitek® 2 Compac 15 da bioMérieux	Sistema automatizado de leitura espectrofotométrica de cartas de identificação de microrganismos e de leitura cinética turbidimétrica de cartas de TSA.
LabUReader Plus 2	Analisador de urina semiautomático.
GeneXpert® da Cepheid	Equipamento para diagnóstico molecular que utiliza a reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real Time – Polymerase Chain Reaction, RT-PCR).
Densitômetro Densimat da bioMérieux	Densitômetro portátil, utilizado para medir a densidade óptica de uma suspensão microbiana (pura).
Câmara de fluxo laminar (modelo 1169) da Forma Scientific	Câmara de fluxo laminar com filtro absoluto HEPA (classe II tipo B2), utilizada para processamento das amostras em condições de segurança laboratorial – circulação unidirecional de ar mantendo esterilidade dentro da cabine.
Estufas de incubação	Estufa a 37°C e atmosfera com 5% de CO ₂ Estufas a 25°C, 30°C, 37°C e 42°C e atmosfera ambiente.
Aerospray® Gram Slide Stainer / Cytocentrifuge	Coloração de Gram automatizada, de esfregaços realizados do produto ou de colónias puras.
Aerospray® TB Slide Stainer / Cytocentrifuge	Coloração de Kinyoun automatizada. Esta coloração permite a detecção de bacilos ácido-resistentes (B.A.A.R), tais como o <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ou micobactérias atípicas.
Microscópios óticos	Observação de esfregaços e preparações a fresco.

7.1. IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS

Os métodos de identificação disponíveis no setor permitem a identificação presuntiva e definitiva dos microrganismos. As características macroscópicas e microscópicas das colónias utilizando meios de cultura adequados associados a provas manuais bioquímicas (caso sejam necessárias) e testes imunológicos, contribuem para uma detecção e identificação presuntiva dos microrganismos.

Para a identificação definitiva é utilizado o Vitek® 2 Compac 15 da bioMérieux. Neste equipamento existem 5 tipos de cartas de identificação para microrganismos: Gram Negativo (GN), Gram Positivo (GP), Neisseria e Haemophilus (NH), Anaeróbios (ANC) e Fungos (YST).

7.1.1. Exame Direto e Colorações

O exame macroscópico permite avaliar diversas características da amostra tais como: consistência, cor e a presença de sangue ou muco.

O exame direto microscópico da amostra pode ser realizado a fresco ou após coloração. No exame a fresco pode ser necessário uma preparação prévia da amostra consoante os microrganismos suspeitos (como exemplo: adição de uma solução de KOH a uma amostra de tecido para observação de estruturas fúngicas). A sua observação também permite avaliar a presença de células, a mobilidade e morfologia dos microrganismos presentes.

O exame direto após coloração permite detetar as características morfológicas dos microrganismos e das células presentes na amostra. Para a observação microscópica de bactérias, com o intuito de avaliar a sua morfologia (cocos, bacilos, cocobacilos), tamanho e agrupamento de cocos (diplococos, estafilococos, estreptococos) e de bacilos (diplobacilos, estreptobacilos), é necessário a realização e coloração de um esfregaço.

Um esfregaço consiste em espalhar ao longo de uma lâmina, devidamente identificada, uma porção adequada de amostra, que após secar é fixado ao calor.

Nos esfregaços corados pela coloração de Gram é necessário referir a quantidade de leucócitos em amostras, tais como expetoração e exsudados. Nos produtos respiratórios é quantificado as células epiteliais (como numa expetoração) ou as células brônquicas (como num aspirado brônquico).

Coloração de Gram

A coloração de Gram é uma coloração diferencial, isto é, utiliza dois corantes e permite distinguir grupos de bactérias com base na sua capacidade de retenção desses corantes.

Os corantes utilizados são o cristal violeta (corante primário) e a fucsina (corante secundário). Além dos corantes utiliza-se também soluto de lugol (mordente) e álcool-acetona (diferenciador).

A natureza química da parede celular bacteriana é o fator predominante no resultado da coloração de Gram. As bactérias que retêm o corante primário devido à maior espessura

da camada de peptidoglicano designam-se por bactérias Gram positivo e aparecem coradas de roxo, por outro lado as bactérias que possuem uma menor espessura da camada de peptidoglicano são consideradas Gram negativo e coram de rosa devido ao corante secundário (20).

Coloração de Kinyoun

A coloração de Kinyoun permite a observação de bacilos ácido-álcool resistentes (B.A.A.R), principalmente os do género *Micobacterium*. Estes microrganismos possuem uma parede celular com um grande conteúdo lipídico, em particular o ácido micólico. A coloração de Kinyoun é semelhante à coloração de Ziehl-Neelsen, no entanto dispensa a utilização de calor (21). Numa amostra positiva para B.A.A.R, estes microrganismos coram de rosa-escuro/vermelho, enquanto as restantes bactérias presentes na amostra, assim como o fundo do esfregaço, coram de azul.

Coloração com azul de lactofenol

A coloração com azul de lactofenol é utilizada como auxílio na identificação de fungos filamentosos após a cultura. O corante é constituído por três componentes: fenol (mata qualquer organismo vivo presente), ácido láctico (preserva as estruturas fúngicas) e azul de algodão (cora a quitina da parede celular fúngica conferindo-lhe uma tonalidade azul) (22).

7.1.2. Meios de cultura

No SPCL são utilizados meios de cultura sólidos e líquidos, estes podem ser classificados em meios seletivos, não seletivos e diferenciais.

A observação dos meios semeados permite uma identificação presuntiva devido às características dos mesmos (Tabela 12).

Tabela 12: Meios utilizados no setor de microbiologia do SPCL e os seus princípios (23).

Meio	Princípio
MEIOS SÓLIDOS	
Gelose de Columbia + 5% de Sangue de Carneiro (COS)	Meio de isolamento que facilita o crescimento de microrganismos exigentes. A presença de sangue permite a distinção de hemólise.
Gelose MacConkey (MCK)	Meio seletivo para bactérias de Gram negativo através dos sais biliares e cristal violeta. Bactérias fermentadoras da lactose originam colónias de cor rosa e o meio muda de cor para rosa mais escuro. As que não fermentam a lactose

	originam colónias incolores e o meio muda de cor para acastanhado.
Gelose Chocolate PolyVitekX (PVX)	Meio enriquecido com fatores X (hemina) e V (NAD) fornecidos pela hemoglobina e pelo PolyVitekX. Utilizado no isolamento de microrganismos fastidiosos tais como: <i>Haemophilus</i> , <i>Neisseria</i> e <i>Streptococcus pneumoniae</i> .
Gelose Cistina, Lactose, Deficiente em Eletrólitos (CLED)	Meio não seletivo e diferencial utilizado no isolamento de microrganismos urinários. Permite diferenciar os microrganismos fermentadores da lactose (colónias amarelas-pálidas e amarelas, por acidificação do meio) dos não fermentadores da lactose (colónias verdes, azuis ou incolores).
Gelose Columbia ANC + 5% de sangue de carneiro (CNA)	Meio de isolamento seletivo que permite o desenvolvimento das bactérias Gram positivo. A presença de ácido nalidixico e de colistina permite inibir a maioria das bactérias Gram negativo e bacilos. A presença de sangue permite a distinção de hemólise.
Gelose Hektoen Enteric Agar (HE Agar)	Meio para diferenciação moderadamente seletivo utilizado para o isolamento e cultura de microrganismos entéricos Gram negativo, especialmente para o isolamento de <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i> em amostras fecais. A diferenciação das <i>Enterobacteriales</i> baseia-se na sua capacidade de fermentação de vários açúcares (lactose, sacarose e salicina). Devido à presença de sais biliares, é inibido o crescimento dos microrganismos Gram positivo.
Gelose xilina lisina desoxicolato (XLD)	Meio de isolamento seletivo e de diferenciação destinado à deteção de <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i> (colónias rosas/vermelhas com ou sem centro negro) em amostras fecais. Bactérias que fermentam um dos três açúcares do meio, formam colónias amarelas ou laranjas.
Gelose Schaedler +5%de sangue de carneiro (SCS)	Meio de isolamento para pesquisa das bactérias anaeróbias estrias e facultativas. A presença de fatores de crescimento (extrato de leveduras, hemina e vitamina K3) permitem o crescimento de espécies mais exigentes. A presença de um redutor(L-cistina) e de glucose muito concentrada favorecem o desenvolvimento das bactérias anaeróbias.
Gelose Mueller Hinton 2 (MH2)	Meio utilizado na realização do antibiograma por difusão para bactérias não exigentes.
Gelose Mueller Hinton 2 + 5% de sangue de carneiro (MHS)	Meio destinado à realização de antibiogramas por difusão para as bactérias mais fastidiosas, que necessitem de sangue para o seu crescimento.
Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol 2 (SGC2)	É um meio seletivo recomendado para o isolamento das leveduras e fungos filamentosos a partir de amostras polimicrobianas. A presença de peptonas, glucose e pH ácido favorece o desenvolvimento dos fungos. A presença de gentamicina e cloranfenicol permitem inibir a maioria das bactérias Gram negativo e positivo.
Gelose de contacto (CT)	Meio utilizado para estabelecer ou rever as técnicas e programas de controlo microbiológico das superfícies.
Haemophilus Chocolate 2 agar HAE2	Meio seletivo para o isolamento de diferentes espécies de <i>Haemophilus</i> de amostras polimicrobianas.

MEIOS LÍQUIDOS	
Meio ureia indol (UI-F)	Meio utilizado para detetar nas enterobactérias a presença de urease, de triptofano-desaminase e a produção de indol.
Caldo Schaedler + vit. K3 (SCHEDIK3 B-T)	Caldo especialmente adaptado ao crescimento dos microrganismos anaeróbios. O poder redutor e a presença de vários fatores de crescimento (hemina, extrato de levedura, vitamina K3) facilitam o desenvolvimento destes microrganismos.
Brain Heart Infusion (BHI)	Meio líquido de utilização geral para o crescimento de uma grande variedade de bactérias e fungos.
Caldo de Gram Negativo (GN)	Meio de enriquecimento seletivo para microrganismos entéricos Gram negativo.
Caldo selenito-F	Caldo enriquecido utilizado no isolamento de <i>Salmonella spp.</i> E algumas espécies de <i>Shigella</i> .
BACTEC™ Aeróbia Plus/F	Meio líquido utilizado para cultura e isolamento de bactérias aeróbias e leveduras em amostras biológicas (sangue e líquidos biológicos). Cada frasco contém um sensor químico que consegue detetar aumentos de CO ₂ produzidos pelo crescimento dos microrganismos.
BACTEC™ Anaeróbia Plus/F	Meio líquido utilizado para cultura e isolamento de bactérias anaeróbias em amostras biológicas. Cada frasco contém um sensor químico que consegue detetar aumentos de CO ₂ produzidos pelo crescimento dos microrganismos.
BACTEC™ Peds Plus/F	Meio líquido utilizado para cultura e isolamento qualitativo de microrganismos aeróbios (sobretudo bactérias e leveduras) em amostras biológicas com volume de 1mL a 3mL.
BACTEC™ Myco/F Lytic	Meio líquido Middlebrook 7H9 modificado que funciona como meio de cultura não seletivo para cultura e o isolamento qualitativo de micobactérias em amostras de sangue.

7.1.3. Provas Bioquímicas

As características metabólicas dos microrganismos permitem a realização de provas bioquímicas que proporcionam uma identificação presuntiva, contribuindo para o estudo microbiológico.

No entanto, a utilização de algumas destas provas encontra-se em desuso, sendo apenas realizadas algumas em caso de dúvida, de modo a prosseguir com o estudo microbiológico.

Tabela 13: Provas bioquímicas utilizadas no setor de microbiologia do SPCL.

Provas bioquímicas	Identificação presuntiva
Prova da oxidase	Microrganismos com atividade citocromo oxidase (ex: <i>Pseudomonas</i>)
Prova da catalase	Distinção entre <i>Staphylococcus spp.</i> (catalase positiva) e <i>Streptococcus spp.</i> (catalase negativa)
Teste da coagulase	Distinção entre <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (<i>S. aureus</i>) e <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
Teste da optoquina	Identificação de <i>Streptococcus pneumoniae</i> (suscetível)

7.2. TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos são efetuados, validados e reportados de acordo com as normas e orientações publicadas pela entidade reguladora EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) e tendo em conta dados epidemiológicos locais.

No setor de microbiologia do SPCL a maioria dos TSA são realizados no Vitek® 2 Compac 15 da bioMérieux. Para a realização deste teste é efetuada uma suspensão do microrganismo (proveniente de uma colónia pura) com a densidade recomendada, consoante o tipo de carta que será utilizada.

No entanto, pode ser necessário completar o estudo com testes manuais. Estes são realizados: quando há necessidade de estudar antimicrobianos que não estejam presentes nas cartas do Vitek® 2 Compac 15; quando não é possível obter o TSA pelo método automático; e para a deteção de alguns mecanismos de resistência.

7.2.1. Testes manuais de determinação da suscetibilidade a antimicrobianos

Kirby-Bauer (Difusão em disco)

O método de Kirby-Bauer consiste na preparação de uma suspensão bacteriana, proveniente de uma cultura pura, com uma turvação de 0,5 McFarland para microrganismos aeróbios e 1 McFarland para microrganismos anaeróbios. A suspensão bacteriana é inoculada pela técnica de sementeira em tolha em gelose de Muller-Hinton ou, caso se trate de um microrganismo fastidioso, é utilizada a gelose Mueller-Hinton com 5% de sangue de carneiro. São utilizados discos de papel de filtro impregnados com um agente antimicrobiano de concentração conhecida que são distribuídos pela superfície do meio de forma a permitir a formação de halos de inibição. Após o período de incubação a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ para aeróbios e incubação a 37°C em anaerobiose para anaeróbios, os halos são medidos e interpretados através das regras da EUCAST. O microrganismo é classificado como suscetível, suscetível com exposição aumentada ou resistente, relativamente ao antimicrobiano presente no disco. Permite também a deteção de mecanismos de resistência, através de avaliação do sinergismo, pela combinação de dois discos com antimicrobianos diferentes (24).

Difusão em gradiente (E-test®)

Tiras impregnadas com um gradiente conhecido de antimicrobiano são colocadas à superfície de um meio de MH2 (aeróbios) ou MHS (anaeróbios e microrganismos fastidiosos), que é previamente inoculado pela técnica de sementeira em toalha com uma suspensão bacteriana, proveniente de uma colónia pura, com uma turvação de 0,5 McFarland para microrganismos aeróbios e 1 McFarland para microrganismos anaeróbios. Após o período de incubação a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ para aeróbios e incubação a 37°C em anaerobiose para anaeróbios, observa-se uma zona de inibição com formato elipsoidal e simétrica dos dois lados da tira. É aferida a concentração inibitória mínima no ponto de interseção entre a zona de inibição do crescimento microbiano e a tira de E-test® (24).

7.3. ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Urina

O estudo bacteriológico da urina é o mais frequentemente realizado no setor de microbiologia. Este estudo é realizado quando há suspeita de infeções urinárias, que podem ser classificadas em infeções do trato urinário superior (pielonefrite) ou do trato urinário inferior (cistite e uretrite). Estas infeções são mais frequentes em indivíduos do sexo feminino. Entre outros fatores, esta propensão é devida à anatomia do sistema urinário, com uma uretra mais curta em relação à uretra do sistema urinário masculino (25).

Devido à proximidade da uretra com a região perianal, as infeções originadas por bactérias pertencentes à microbiota entérica são as mais comuns, tornando a infeção por *Escherichia coli* a mais frequentemente detetada. No entanto, como a maioria das amostras que chegam a este setor do IPOCFG são provenientes de indivíduos imunodeprimidos, frequentemente são identificados agentes patogénicos mais incomuns do que na população em geral, como *Proteus*, *Klebsiella spp.* e *Pseudomonas aeruginosa*.

A principal amostra de urina para análise no laboratório é a colhida através do jato intermédio. Porém, pode ser colhida através de cateter, punção suprapúbica ou por drenagem de nefrostomia. O acondicionamento e transporte da amostra é realizado num contentor estéril, devidamente identificado, e caso seja colhida pelo doente, este deve ser devidamente informado da forma mais correta de a efetuar.

No processamento desta amostra é realizado a sumária de urina tipo II, que consiste na leitura de tiras de testes no leitor (Tabela II) onde se determina a densidade, glicose, proteínas, corpos cetónicos, bilirrubina, urobilinogénio, nitritos, leucócitos e eritrócitos, é também acrescentado o aspeto macroscópico (cor e turvação)(26). Seguidamente é feita a

observação microscópica do sedimento urinário, onde é observada a presença de células (eritrócitos, leucócitos, células epiteliais), bactérias, leveduras, cilindros e cristais se existirem.

Para o estudo bacteriológico, são realizadas sementeiras quantitativas (por estria central com esgotamento utilizando uma ansa de 1 µL) nos meios de cultura CLED (onde é feita a contagem de colónias), MCK (onde é feita a identificação para bacilos Gram negativos) e CNA (onde podem ser observadas bactérias Gram positivas e leveduras). Os meios são incubados a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. A valorização das estirpes bacterianas é realizada consoante o número de colónias, informação disponibilizada pela sumária de urina e sedimento urinário, método de colheita e informação clínica do indivíduo.

Fezes

As infeções gastrointestinais podem ser originadas por diversos agentes patogénicos como bactérias, parasitas ou vírus.

As amostras de fezes são colhidas para um contentor estéril. No caso da amostra ser colhida na instituição, a mesma deve ser transportada o mais rapidamente possível para o laboratório, enquanto se a amostra for colhida pelo utente em ambulatório é recomendado que a amostra seja conservada no frigorífico até ao transporte para o laboratório.

O processamento da amostra começa com a observação do aspeto macroscópico onde é avaliada a cor, consistência, presença de sangue, muco ou parasitas.

No estudo bacteriológico das fezes é efetuada a pesquisa principalmente de *Salmonella spp.* e *Shigella spp.*. A amostra é semeada nos meios de cultura sólidos Hektoen e XLD e nos meios de enriquecimento Caldo de selenito e Caldo de Gram negativo (posteriormente são replicados para os meios sólidos). Após o período de incubação a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, são valorizadas as colónias não fermentadoras da lactose que poderão ser *Salmonella spp.* e/ou *Shigella spp.*.

No estudo parasitológico é efetuado o método de Ritchie em três amostras colhidas em dias diferentes. Posteriormente é feita a observação microscópica para a pesquisa de quistos, ovos e/ou formas adultas de parasitas.

Devido a dificuldade de crescimento ou de observação de alguns microrganismos são realizados testes imunocromatográficos para a pesquisa de *Campylobacter spp.*, *Criptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* e *Clostridioides difficile* (Toxina A e B).

Sangue

O sangue é considerado um produto biológico estéril, assim torna-se imprescindível que a colheita seja realizada em condições de assepsia de forma a evitar contaminações com outros microrganismos que não aqueles que estão a causar infeção (tais como: *Staphylococcus coagulase negativa* pertencente à microbiota da pele). Esta colheita é efetuada preferencialmente antes do início da antibioterapia e com inoculação de volumes adequados nos frascos de hemocultura (Tabela 12).

Neste setor, a deteção de microrganismos no sangue é realizada num sistema automatizado (Tabela 12) que permite uma incubação a 37°C com monitorização continua das hemoculturas e assim deteção de culturas positivas. As hemoculturas incubam durante um período máximo variável consoante a garrafa, microrganismo suspeito ou até ser detetado crescimento por fluorimetria (hemocultura positiva). Após o período de incubação de sete dias para bactérias, 14 dias para fungos e 42 dias para micobactérias, caso não se verifique o desenvolvimento de microrganismos, as hemoculturas são dadas como negativas.

Quando surge uma hemocultura positiva, é efetuado um esfregaço corado pela coloração de Gram a partir da garrafa de hemocultura, e é inoculada em COS e incubada a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ de 24 a 48 horas.

A observação microscópica do esfregaço proporciona uma identificação presuntiva do microrganismo presente. Esta informação deve ser transmitida ao clínico o mais rapidamente possível de forma a orientar a terapêutica.

Posteriormente é efetuada uma identificação definitiva do microrganismo e realizado o TSA sempre que clinicamente relevante.

Secreções respiratórias (expetoração, lavados, escovados e aspirados brônquicos)

O trato respiratório é dividido em duas partes. O trato respiratório superior que possui uma flora bacteriana diversa e o trato respiratório inferior que não possui flora bacteriana. Assim, embora uma amostra de expetoração seja relativamente fácil de obter, esta frequentemente sofre contaminações durante a colheita com flora da orofaringe.

As amostras de expetoração podem ser colhidas pelo utente, desde que devidamente instruído a colher uma amostra de qualidade e representativa do trato respiratório inferior. Caso o utente não consiga efetuar devidamente a colheita será necessário a intervenção de profissionais de saúde, assim como se for necessário recolher outro tipo de amostras do trato respiratório inferior como os lavados, escovados e aspirados brônquicos

O número total de amostras colhidas e enviadas para o laboratório difere consoante o estudo microbiológico que se pretende realizar. Para a pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis* são necessárias três amostras de expectoração colhidas em dias diferentes.

Antes do processamento destas amostras, é importante classificar o aspeto macroscópico da expectoração (como exemplo: amostra hemoptóica, aspeto purulento, aspeto de saliva).

Posteriormente, para a expectoração é realizado um esfregaço geralmente pela técnica de esmagamento corado pela coloração de Gram e para os lavados, escovados e aspirados brônquicos devem ser centrifugados e realizado o esfregaço do sedimento corado pela coloração de Gram.

A observação microscópica do esfregaço permite a avaliação de elementos celulares e de flora presentes. A qualidade da amostra é avaliada segundo os critérios de *Murray e Washington* (Tabela 14). Idealmente a mostra deverá cumprir os parâmetros do grupo 5.

Tabela 14: Sistema de avaliação de qualidade de amostra segundo critérios de *Murray e Washington*. (Fonte SPCL IPOCFG, E.P.E.).

	Células epiteliais por campo (objetiva 10x)	Leucócitos por campo (objetiva 10x)
Grupo 1	25	10
Grupo 2	25	10-25
Grupo 3	25	25
Grupo 4	10-25	25
Grupo 5	<10	25

É realizada a inoculação destas amostras em COS, PVX, HAE2 e SGC2 e incubam a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ durante 24 a 48 horas. Se houver suspeita de fungos filamentosos, a incubação deve ser a 30°C até 30 dias.

Caso haja contaminação como flora do trato respiratório superior, há crescimento de microbiota da orofaringe nos meios de cultura o que dificulta a deteção e isolamento do agente patológico. Uma nova amostra poderá ser pedida sempre que necessário (se existirem dúvidas na valorização e validação de um microrganismo isolado).

Para a pesquisa de bacilos ácido-álcool resistentes é realizada um esfregaço corado pela coloração de Kinyoun. A observação microscópica para a deteção de B.A.A.R deve ser minuciosa devido à dificuldade de observação destes bacilos. No entanto, um exame microscópico negativo não implica que o indivíduo não se encontre infetado e deverá ser feito um estudo micobacteriológico.

Tabela 15: Interpretação de um esfregaço corado pela coloração de Kinyoun para pesquisa de B.A.A.R (Fonte SPCL IPOCFG, E.P.E.).

Número de B.A.A.R observados (100X)	Interpretação
0	Negativo
1-2/300 campo	Duvidoso (confirmar)
1-9/100 campo	1+
1-9/10 campo	2+
1-9/campo	3+
>9/campo	4+

Neste setor pode ser feita a pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis* por biologia molecular pela técnica de PCR em tempo real no equipamento GeneXpert® da Cepheid. De seguida, a amostra é enviada para o CHUC para exame cultural.

Exsudados purulentos (superficiais e profundos)

Os exsudados purulentos são divididos em superficiais e profundos consoante o local anatómico da colheita. A forma mais adequada de colher esta amostra e de a transportar depende do local anatómico da colheita, bem como dos microrganismos suspeitos (aeróbios ou anaeróbios). Na colheita destas amostras é necessário proceder de forma correta de modo a evitar contaminação com a microbiota da pele.

As amostras de exsudado superficial são colhidas com recurso a zaragatoa com meio de transporte de Amies ou Stuart.

As amostras de exsudado profundo são colhidas para contentor estéril ou com agulha e seringa de modo a obter-se uma amostra mais representativa. Na suspeita de bactérias anaeróbias, as amostras devem ser transportadas em frasco de Portagerme™ ou colhidas para seringa capsulada.

No processamento destas amostras é efetuado um esfregaço corado pela coloração de Gram. É feita a inoculação em COS, PVX e SGC2 e incubadas na 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ durante 24 a 48 horas. Para pesquisa de anaeróbios, caso seja possível tendo em conta o meio de transporte, a amostra é inoculada em SCS e incuba em anaerobiose a 37°C até 5 dias.

Na valorização das culturas é necessário distinguir entre colónias da microbiota da pele e os agentes patogénicos que podem estar a provocar infeção.

Exsudados vaginais

Uma mulher em idade fértil possui uma flora vaginal abundante, constituída sobretudo por *Lactobacillus* spp.. Estes bacilos originam um pH vaginal relativamente ácido que impedem a proliferação de outros microrganismos da flora que poderão provocar infeção.

A análise de rotina desta amostra engloba a análise citobacteriológica, micológica e parasitológica. A colheita é realizada com zaragatoa com meio de transporte de Amies ou Stuart e deve ser mantida a 37°C para viabilizar a observação de parasitas móveis, tais como *Trichomonas vaginalis*. Para pesquisa de *Neisseria gonorrhoeae*, a amostra deve ser colhida em zaragatoa de Rayon ou com carvão ativado para neutralizar o efeito toxico das fibras de algodão da zaragatoa.

No processamento é realizado um esfregaço corado pela coloração de Gram, onde é observado a presença de leucócitos, células epiteliais, flora microbiana, possíveis agentes patogénicos e *clue cells*. É realizado um exame a fresco com soro fisiológico para pesquisa de trofozoítos de *Trichomonas vaginalis*. É feita a inoculação em COS, PVX e SGC2 e incuba a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ durante 24 horas.

A valorização dos microrganismos é realizada tendo em conta a informação clínica. Caso sejam identificados microrganismos, são realizados testes de suscetibilidade aos antimicrobianos.

Líquidos biológicos serosos (Líquido pleural e líquido peritoneal)

Os líquidos biológicos serosos são usualmente estéreis, por este motivo qualquer microrganismo neles identificados é valorizável.

Estas amostras são colhidas para um contentor estéril ou para frasco Portagerme™ se suspeita de bactérias anaeróbias.

No processamento destas amostras começa-se por avaliar o aspeto macroscópico como: cor, turvação, presença de sangue ou pus. Para a observação microscópica, preferencialmente é realizada uma centrifugação e posteriormente um esfregaço do sedimento corado pela coloração de Gram.

A amostra de líquido pleural é inoculada por inundação em COS, PVX e SGC2 e incubada a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ durante 24 a 48 horas. É também inoculado o meio líquido BHI que incuba durante 72 horas, no entanto caso apresente turvação durante a incubação é realizado um esfregaço e é repicado para COS e PVX.

A amostra de líquido peritoneal é inoculada por inundação em COS, CLED e SGC2 e é também inoculado produto em Caldo de carne e incuba a 37°C em atmosfera com 5% de

CO₂ durante 24 a 48 horas. Se suspeita de anaeróbios é inoculada em SCS e KV 37°C em anaerobiose até 5 dias.

Biópsias e fragmentos de tecidos

O estudo microbiológico realizado numa biópsia gástrica consiste na pesquisa de *Helicobacter pylori*. Esta bactéria consegue sobreviver ao pH ácido do estômago e crescer na mucosa gástrica. Está associada à gastrite crónica do tipo B, usualmente não dá sintomatologia e está envolvida na patogénese da úlcera duodenal e da úlcera gástrica. Encontra-se também associada ao desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico e raramente ao desenvolvimento de linfoma das células B da mucosa gástrica. O *Helicobacter pylori* é um bacilo em espiral Gram negativo, flagelado e urease positivo o que auxilia a sua identificação (27).

A colheita desta amostra é realizada exclusivamente por um médico gastroenterologista, através de uma endoscopia digestiva, onde é inserido o endoscópio e feitas biópsias do corpo e antro gástrico.

As amostras são colocadas em meio de transporte específico (Portagerm pylori) e enviada para o INSA, para estudo bacteriológico e eventual teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, em caso de resultado positivo.

São também recebidas no laboratório biópsias provenientes de outros tecidos para estudo microbiológico.

Líquido cefalorraquidiano (LCR)

A infeção do Sistema Nervoso Central é considerada uma emergência médica, pelo que o diagnóstico e implementação de terapêutica antimicrobiana devem ser realizados o mais rapidamente possível. Por este motivo, o LCR requer um transporte e processamento imediato. A colheita é feita por punção lombar pelo médico, para um contentor estéril.

Primeiramente deve ser avaliado o aspeto macroscópico do LCR como: cor, turvação e presença de sangue. Para a observação microscópica, preferencialmente é realizada uma centrifugação e posteriormente um esfregaço do sedimento corado pela coloração de Gram. É avaliado a presença de leucócitos e microrganismos.

É inoculado por inundação em COS e PVX e incuba a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ durante 48 a 72 horas, com avaliação diária, e inoculado em SGC2 que incuba a 30°C durante 4 semanas. É também inoculado no meio líquido de enriquecimento BHI, que incuba a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ e caso apresente turvação é realizado um esfregaço e é repicado para COS e PVX.

Se for solicitado pelo clínico o teste Multiplex, um teste de biologia molecular para detecção de vários microrganismos em simultâneo (tais como: vírus, bactérias e fungos mais frequentes e/ou patogénicos) a amostra de LCR é enviada para o CHUC.

Ponta de cateter

Em doentes oncológicos é crucial que haja um acesso venoso estável que é utilizado para diversos procedimentos, incluindo quimioterapia e administração de antibióticos. De modo a permitir este acesso é implementado a estes doentes um cateter venoso central ou periférico de longa duração. Esta implementação pode acarretar várias complicações como hemorragias, arritmia cardíaca, trombozes e infeções (28). Assim, é essencial monitorizar os cateteres como possível fonte de infeção, pois a sua colonização por microrganismos pode resultar numa infeção localizada ou numa septicémia.

Após a sua remoção, corta-se um segmento com cerca de 5 centímetros a partir da ponta terminal, que é colocado num contentor estéril e enviado para o laboratório. Simultaneamente é colhida amostra para hemocultura, cujo resultado é correlacionado com os obtidos para a ponta do cateter.

No processamento desta amostra é efetuada uma sementeira semi-quantitativa com rolamento da ponta do cateter na superfície de uma placa de COS, que incuba a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ durante 24 horas. A ponta de cateter é colocada em meio de enriquecimento BHI e incuba nas mesmas condições. Caso haja turvação do meio é realizado um esfregaço corado pela coloração de Gram e inoculação em COS que incuba a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. São valorizadas culturas provenientes do cateter em simultâneo com os resultados das hemoculturas.

Estudo Micológico

As micoses são provocadas por fungos leveduriformes ou filamentosos e clinicamente, estas infeções podem ser classificadas em superficiais (cutâneas), subcutâneas, sistémicas ou oportunistas (29).

Os indivíduos imunocomprometidos são mais suscetíveis a desenvolver infeções devido a fungos oportunistas que usualmente pertencem a flora microbiana do individuo ou que usualmente não são considerados patogénicos para um individuo não imunocomprometido (29).

Para a identificação do fungo que está a originar infeção, devem ser colhidas amostras de forma correta consoante o tipo de micose. No processamento destas amostras, é realizado

o exame direto a fresco entre lâmina e lamela com adição de uma solução de KOH, cuja percentagem varia consoante o tipo de tecido. A solução de KOH destrói a queratina do tecido, permitindo a observação das estruturas fúngicas. Para o exame cultural, é realizada a inoculação da amostra em placas de SGC2 que incubam a diferentes temperaturas consoante o tipo de fungo suspeito (25°C, 30°C ou 37°C).

É realizada a observação das placas periodicamente, onde é avaliada a presença de crescimento de fungos relevantes e ao fim de 1 mês de incubação, caso não haja crescimento dos mesmos o resultado é dado como negativo.

Para um fungo ser considerado relevante é necessário que o mesmo fungo cresça nas duas geloses SGC2 sujeitas as mesmas condições. Caso isso não aconteça e só haja crescimento numa das geloses ou haja crescimento de diversos fungos a amostra é considerada contaminada com fungos ambientais.

A identificação dos fungos é realizada pela observação das características morfológicas das colónias. Para fungos filamentosos, macroscopicamente é avaliada (frente e verso) pigmentação, textura/aspecto, micélio (aéreos ou rasteiros), temperatura e tempo de crescimento. Para a observação microscópicas do fungo é preparada uma lâmina utilizando a técnica da fita-cola com azul de lactofenol. Microscopicamente são observadas hifas (asseptadas ou septadas) e estruturas reprodutoras.

Para fungos leveduriformes, macroscopicamente é observada a cor (tal como: branco/bege ou rosa/salmão) e textura (lisa, rugosa, brilhante, baça, cremosa, seca, bordo regular ou irregular). Microscopicamente, os fungos leveduriformes se estiverem presentes na amostra são facilmente detetados pela coloração de Gram, onde são observadas células vegetativas, blastósporos, pseudofilamentos, artrósporos e filamentos verdadeiros.

Após a identificação de leveduras, caso se verifique clinicamente relevante, é realizado o teste de suscetibilidade a antimicrobianos.

Controlo microbiológico da farmácia

Na farmácia hospitalar do IPOCFG é efetuada a preparação de citostáticos utilizados nos tratamentos dos doentes. Por este motivo é essencial que a sala se mantenha estéril. De forma a controlar a assepsia é fundamental realizar periodicamente o controlo microbiológicos dos locais de preparação e dos técnicos.

Controlo de qualidade microbiológico dos endoscópios e broncofibroscópios

Este controlo de qualidade é realizado de acordo com as normas da ESGE-ESGENA 2007 com adaptação à realidade do SPCL do IPOCFG.

É realizado o estudo microbiológico ao líquido de passagem pelos canais de trabalho dos endoscópios e broncofibroscópios, e à água de enxaguamento final das máquinas utilizadas no seu reprocessamento.

7.4. CASO CLÍNICO

Homem de 59 anos, seguido no IPOCFG por carcinoma urotelial metastizado, com nefrostomia bilateral funcional, foi internado no dia 24/04/2023 para realização de cistectomia radical. À entrada, encontrava-se febril, com temperatura máxima de 38,6°C e com queixas de dor na região perianal.

Ao exame objetivo, realizado pelo médico assistente, apresentava edema escrotal e peniano com rubor e calor local, dor ao toque e exsudado uretral purulento abundante.

Foram pedidos vários exames complementares de diagnóstico e o doente foi medicado empiricamente com Ceftriaxone.

Neste relatório é apresentado os resultados dos parâmetros considerados relevantes para este diagnóstico (Tabela 16).

Tabela 16: Resultados das análises laboratoriais (Fonte SPCL IPOCFG, E.P.E.).

Parâmetros	Resultados	Valores de referência	Unidades
Leucócitos	10,4	4,0 – 11,0	10 ³ /μL
Neutrófilos	8,4 (81%)	1,8 – 7,0	10 ³ /μL
Linfócitos	1,0 (9,5%)	1,0 – 5,0	10 ³ /μL
Monócitos	1,0 (9,2%)	0,1 – 1,2	10 ³ /μL
Eosinófilos	0,0 (0,0%)	0,0 – 0,6	10 ³ /μL
Basófilos	0,3 (0,0%)	0,0 – 0,2	10 ³ /μL
PCR (ultra-sensível)	12,9	<=0,30	mg/dL
Procalcitonina	0,33	<=0,50	mg/dL

Para a pesquisa de agente infeccioso, foram colhidos dois frascos de hemocultura, urina das nefrostomias direita e esquerda e realizada a colheita de exsudado ureteral com zaragatoa. As amostras foram enviadas o mais rapidamente possível ao laboratório e processadas como descrito anteriormente.

Resultados do estudo microbiológico

Hemoculturas

1ª amostra (aerobiose) – negativo após período de incubação (7dias)

2ª amostra (aerobiose) – negativo após período de incubação (7dias)

Urina da nefrostomia direita e esquerda

Foi realizado a sumária de urina, observação do sedimento urinário (Tabela 17) e efetuada a urocultura.

- Sumária de urina tipo II e Sedimento urinário

Tabela 17: Resultados da sumária de urina e do sedimento urinário realizados à urina das nefrostomias direita e esquerda. (Fonte SPCL IPOCFG, E.P.E.).

Parâmetros	Urina Nefrostomia Esquerda	Urina Nefrostomia Direita	Valores de referência	Unidades
SUMÁRIA DE URINA				
Densidade	1,025	1,025	1,016 - 1,022	-
pH	5,5	5,5	4,8 – 7,4	-
Leucócitos	500/µL	500/µL	-	-
Nitritos	Positivo	Positivo	-	-
Proteínas	30	100	0 - 10	mg/dL
Glucose	Normal	Normal	0 - 30	mg/dl
Corpos cetônicos	15	15	0 - 5	mg/dL
Urobilinogénio	2	4	0 - 1	mg/dL
Bilirrubina	Negativo	Negativo	0,0 – 0,2	mg/dL
Eritrócitos	50/ µL	300/µL	0 - 5	mg/dL
Cor	Amarelo	Amarelo	-	-
Aspeto	Turvo	Turvo	-	-
SEDIMENTO URINÁRIO				
Células epiteliais	Raras	Raras	-	-
Eritrócitos	5 – 10/campo	5 – 10/campo	-	-
Leucócitos	>20/campo	>20/campo	-	-
Bactérias	Algumas	Algumas	-	-

- Exame cultural

Após a obtenção de colônias puras dos microrganismos considerados relevantes, constatou-se a presença de dois microrganismos patogênicos, ambos com contagem $>10^5$ UFC/mL (Figuras 5 e 6)



Figura 5: Placa de COS com colônias puras de bactérias Gram positiva β -hemolítica. (Fonte SPCL IPOCFG, E.P.E.).

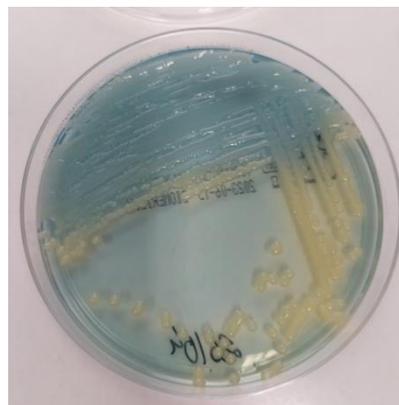


Figura 6: Placa de CLED com colônias puras de bactérias Gram negativa. (Fonte SPCL IPOCFG, E.P.E.).

No Vitek[®] 2 Compac 15 da bioMérieux a bactéria Gram positiva β -hemolítica foi identificada como *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) e a bactéria Gram negativa foi identificada como *Raoultella planticola*.

Exsudado uretral

- Exame microscópico

No exame parasitológico a fresco não se observaram formas parasitárias.

A observação do esfregaço com coloração de Gram evidenciou: Frequentes leucócitos polimorfonucleares, frequentes cocos Gram positivo e bacilos Gram negativo (Figura 7).

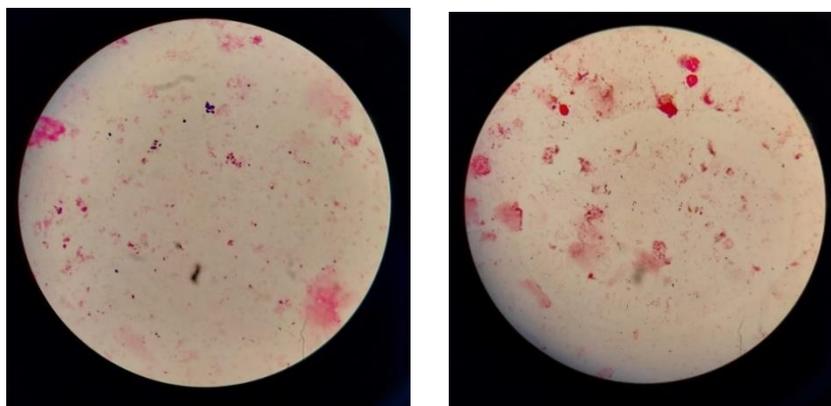


Figura 7: Observação de esfregaço com coloração de Gram. (Fonte SPCL IPOCFG, E.P.E.).

- Exame cultural

Após a obtenção de colónias puras dos microrganismos considerados relevantes, constatou-se a presença de dois microrganismos patogénicos.



Figura 8: Placa de COS com colónias puras de bactérias Gram positiva β -hemolítica.(Fonte SPCL IPOCFG, E.P.E.).

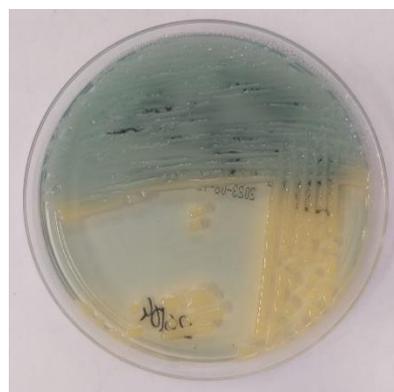


Figura 9: Placa de CLED com colónias puras de bactérias Gram negativa.(Fonte SPCL IPOCFG, E.P.E.).

No Vitek[®] 2 Compac 15 da bioMérieux a bactéria Gram positiva β -hemolítica foi identificada como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e a bactéria Gram negativa foi identificada como *Raoultella planticola*.

Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

Foi realizado o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos para estes dois microrganismos, onde se verificou que a suscetibilidade é igual para os encontrados nas duas amostras (Tabela 18).

Tabela 18: Resultados do teste de suscetibilidade a antimicrobianos ao MRSA e à *Raoultella planticola*; R-Resistente, S-Suscetível, I- Intermédio. (Fonte SPCL IPOCFG, E.P.E.).

Antimicrobiano	MRSA	<i>Raoultella planticola</i>
Amoxicilina	R	R
Amoxicilina/Ácido clavulânico	R	S
Ceftriaxona	R	-
Ciprofloxacina	I	S
Gentamicina	S	S
Piperocilina/Tazobactam	R	S
Trimetoprim/Sulfametoxazol	S	S
Vancomicina	S	-

Conclusão

Tendo em conta os resultados obtidos, constatou-se que este doente apresenta uma infeção do trato urinário por dois microrganismos patogénicos diferentes: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Raoultella planticola*, em que ambos se encontram na uretra e na urina das nefrostomias bilateralmente.

Staphylococcus aureus é responsável por inúmeras infeções, variando de relativamente leves a potencialmente fatais, isto é determinado pela virulência da estirpe, pela quantidade de inóculo e pela condição do sistema imunológico do hospedeiro. Este microrganismo patogénico, está presente em infeções da comunidade, também é responsável por infeções associadas aos cuidados de saúde. O aumento da resistência aos antimicrobianos tem se revelado um problema de saúde pública (30). O MRSA é um microrganismo de notificação obrigatória para o SINAVE, pois apresenta um risco epidemiológico.

Raoultella planticola tem como habitat natural o solo, água e ambientes aquáticos. Este microrganismo é uma fonte rara de infeção, no entanto tem sido considerado como um importante agente patogénico emergente. A cistite é a infeção mais comum associada a *R. planticola*, mas este microrganismo pode originar infeções como prostatite, pneumonia e celulite (31).

Para estes dois microrganismos foi clinicamente relevante efetuar o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos. Como se pode constatar pelos resultados indicados anteriormente, o MRSA é resistente à Ceftriaxona, o antimicrobiano que foi inicialmente prescrito empiricamente. Tendo em conta os resultados do estudo microbiológico proporcionados pelo laboratório, o médico assistente alterou a terapêutica para Trimetoprim/Sulfametoxazol, pois ambos os microrganismos responsáveis pela infeção são suscetíveis a estes antimicrobianos.

8. CONCLUSÃO

A realização do estágio integrado no Mestrado em Análises Clínicas permitiu-me consolidar e aperfeiçoar competências adquiridas ao longo das unidades curriculares do mestrado, bem como a aquisição de outras que me serão úteis no mercado de trabalho.

Durante este período integrei na rotina dos diversos setores do SPCL do IPOCFG, onde tive a oportunidade de processar e manipular diferentes produtos biológicos e contactar com o ambiente de um laboratório de análises clínicas a nível hospitalar. Sendo o IPOCFG um hospital especializado no diagnóstico, tratamento e monitorização de doentes oncológicos, permitiu familiarizar-me com as análises associadas com estes géneros de patologias.

9. BIBLIOGRAFIA

- (1) PORTUGAL, Serviço Nacional de Saúde - **CARACTERIZAÇÃO INSTITUCIONAL**. [Acedido a 19 de janeiro 2023]. Disponível em: <https://www.ipocoimbra.min-saude.pt/category/institucional/caracterizacao-institucional/>
- (2) DASGUPTA, Amitava; WAHED Amer - **Sources of errors in hematology and coagulation** 2ªEd, Hematology and Coagulation, 2020. [Acedido a 13 de fevereiro 2023]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/cold-agglutinin>
- (3) BELLESSO, Marcelo - **Hemo-Citologia**. [Acedido a 26 de janeiro 2023]. Disponível em: <http://hemo-citologia.blogspot.com/2010/08/esfregaco-do-sangue-periferico.html>
- (4) MCPHERSON, Richard A; PINCUS, Matthew R - **Henry's Clinical Diagnosis AND Management BY Laboratory Methods**, 23.^a Ed, ELSEVIER, 2017, ISBN:978-0-323-29568-0. p. 521–522.
- (5) HOFFBRAND, Victor A; MOSS Paul A H - **Fundamentos em Hematologia de Hoffbrand**. 7ªEd. Artmed; 2017, ISBN: 9781118408674/1118408675. p. 23.
- (6) HOFFBRAND, Victor A; MOSS Paul A H - **Fundamentos em Hematologia de Hoffbrand**. 7ªEd.Artmed; 2017, ISBN: 9781118408674/1118408675. p.94-97,111.
- (7) HOFFBRAND, Victor A; MOSS Paul A H - **Fundamentos em Hematologia de Hoffbrand**. 7ªEd.Artmed; 2017, ISBN: 9781118408674/1118408675. p. 281,173.
- (8) GUPTA, K.T.V - **Erythrocyte Sedimentation Rate**, National Library of Medicine. [Acedido a 5 de fevereiro 2023]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557485/>
- (9) HOFFBRAND, Victor A; MOSS Paul A H - **Fundamentos em Hematologia de Hoffbrand**. 7ªEd.Artmed; 2017, ISBN: 9781118408674/1118408675. p.265.
- (10) HOFFBRAND, Victor A; MOSS Paul A H - **Fundamentos em Hematologia de Hoffbrand**. 7ªEd.Artmed; 2017, ISBN: 9781118408674/1118408675. p.272.
- (11) HOFFBRAND, Victor A; MOSS Paul A H - **Fundamentos em Hematologia de Hoffbrand**. 7ªEd.Artmed; 2017, ISBN: 9781118408674/1118408675. p.276.
- (12) BRUNS, Carl A; BURTIS, David E - **Tietz Fundamentals of CLINICAL CHEMISTRY AND MOLECULAR DIAGNOSTICS**, 7ªEd, ELSEVIER, 2015, ISBN: 978-1-4557-4165-6. p. 306–307.

- (13) MOAKE, Joel L - **Síndrome de anticorpos antifosfolipídeos**, Manual MSD, 2021. [Acedido a 11 de fevereiro 2023]. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/hematologia-e-oncologia/distúrbios-trombóticos/síndrome-de-anticorpos-antifosfolipídeos-sap>
- (14) Human Pathology: Case Reports - **Acute megakaryoblastic transformation from essential thrombocythemia**, Vol. 8, 2017. p. 37–40. [Acedido a 11 de fevereiro 2023]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214330016300141>
- (15) ESTADOS UNIDOS, Cleveland Clinic – **Thrombocytosis**. [Acedido a 5 de fevereiro 2023]. Disponível em: <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/13350-thrombocytosis>
- (16) ROHIT, Kumar Agrawal et al. - **Hydroxyurea in Sickle Cell Disease: Drug Review**, National Library of Medicine, 2014. [Acedido a 13 de fevereiro 2023]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4022916/>
- (17) HOFFBRAND, Victor A; MOSS Paul A H - **Fundamentos em Hematologia de Hoffbrand**. 7ª Ed. Artmed; 2017, ISBN: 9781118408674/1118408675. p.38.
- (18) FRANCE. Society for Hematopathology et al. - **Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. World Health Organization Classification of Tumours**, E.S.Jaffe, 2001, ISBN: 9283224116. p.69.
- (19) **BD BACTEC Blood culture system: Introduction, Principle and Processing**. [Acedido a 31 de maio 2023]. Disponível em: <https://universe84a.com/bd-bactec-blood-culture-system/>
- (20) TRIPATHI, Nishant; SAPRA, Amit - **Gram Staining**, National Library of Medicine. [Acedido a 3 de julho 2023]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/>
- (21) WANGER, Audrey - **Biochemical Tests and Staining Techniques for Microbial Identification**, Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology, 2017. [Acedido a 11 de maio 2023]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/kinyoun-stain>
- (22) LECK, Astrid - **Preparation of Lactophenol Cotton Blue Slide Mounts**, National Library of Medicine. [Acedido a 25 de maio 2023]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1706009/>

- (23) Serviço de Patologia Clínica Laboratorial do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gil - **Bulas dos Meios de Cultura.**
- (24) CHRISTENSON, John C et al. - **Laboratory Diagnosis of Infection Due to Bacteria, Fungi, Parasites, and Rickettsiae**, Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. 5ªEd. 2018 [Acedido a 3 de julho 2023]. Disponível em: <https://www.science-direct.com/topics/immunology-and-microbiology/disk-diffusion>
- (25) HARRINGTON, R D; HOOTON, T M - **Urinary tract infection risk factors and gender**, National Library of Medicine. [Acedido a 28 de junho 2023]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11253265/>
- (26) LabURreader Plus 2 Urine Analyzer sw 1.0.13. 2013. Disponível em: www.e77.hu
- (27) FRITZ, Kayser H et al. - **Medical Microbiology**, 2005, ISBN:3-13-134991-7. p. 307.
- (28) SCHIFFER, Charles A et al - **Central Venous Catheter Care for the Patient With Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline**, National Library of Medicine, 2013. [Acedido a 1 de junho 2023]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23460705/>
- (29) TILLE, Patricia M - **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology**. 14ªEd. St. Louis Missouri: Elsevier, 2017, ISBN: 978-0-323-35482-0. p.759.
- (30) MAHON, Connie R; LEHMAN, Donal C - **Textbook of Diagnostic Microbiology**, 7ªEd, Elsevier, ISBN:978-0-323-82997-7. p. 310–20.
- (31) FAGER, Charlotte; Yurteri-Kaplan, Ladin - **Urinary tract infection with rare pathogen Raoultella Planticola: A post-operative case and review**, 2018. [Acedido a 25 de maio 2023]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6249409/>