



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Joana Filipa Prata Morais

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO**  
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

**Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas,  
orientado pela Dra. Fátima Maria Madureira Vale e pela  
Professora Doutora Gabriela Conceição Duarte Jorge da Silva e  
apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de  
Coimbra.**

Setembro de 2022





UNIVERSIDADE D  
**COIMBRA**

Joana Filipa Prata Morais

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO**  
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Dra. Fátima Maria Madureira Vale e pela Professora Doutora Gabriela Conceição Duarte Jorge da Silva e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Estágio Realizado na Unidade Local de Saúde da Guarda

Setembro de 2022



## **Agradecimentos**

Agradeço a todos aqueles que ofereceram um pouco do seu tempo para contribuir para a minha formação.



# Índice

Índice de Figuras .....	iii
Índice de Tabelas .....	iv
Abreviaturas .....	v
Resumo .....	vii
Abstract .....	vii
1 Introdução .....	1
2 O Serviço de Patologia Clínica .....	1
2.1 Fase Pré Analítica .....	2
2.2 Fase Pré Colheita .....	2
2.2.1 Fase da colheita.....	2
2.2.2 Fase pós colheita .....	3
3 Bioquímica.....	3
4 Hematologia.....	4
5 Imunologia.....	4
5.1 Equipamentos.....	5
5.2 Metodologias.....	6
5.3 Doenças Autoimunes.....	7
5.3.1 Doenças autoimunes sistémicas.....	8
5.3.1.1 Anticorpo Anti - Nuclear (ANA).....	9
5.3.1.2 Anticorpo Anti - dsDNA.....	11
5.3.1.3 Anticorpo Anti - Citoplasma dos Neutrófilos (ANCA).....	12
5.3.1.4 Anticorpo Anti - Fator Reumatoide e Anti - Peptídeo Citrulinado Cíclico	14
5.3.1.5 Anticorpo Anti - Cardiolipina e Anti $\beta$ 2 - Glicoproteína .....	14
5.4 Doenças Hepáticas Autoimunes .....	15
5.5 Doença Celíaca.....	16
5.6 Gastrite Autoimune e Anemia Perniciosa .....	17
5.7 Doença Inflamatória Intestinal.....	18
5.8 Alergologia.....	19
6 Microbiologia.....	20
6.1 Equipamentos.....	21
6.2 Exames Microscópicos Diretos – Técnicas de Coloração.....	23
6.2.1 Coloração de Gram.....	23
6.2.2 Coloração de Leishman.....	24

6.2.3	Coloração de Ziehl - Neelsen.....	24
6.2.4	Coloração de Auramina O .....	24
6.3	Exame Cultural – Meios de Cultura.....	24
6.4	Testes de orientação / de identificação presuntiva.....	31
6.5	Identificação bacteriana .....	35
6.6	Produtos biológicos .....	37
6.6.1	Líquido Cefalorraquidiano (LCR).....	37
6.6.2	Outros Líquidos.....	38
6.6.3	Hemoculturas.....	38
6.6.4	Cateter.....	38
6.6.5	Feridas, Pus e Tecidos .....	39
6.6.6	Bílis.....	39
6.6.7	Urina.....	39
6.6.8	Exsudados vaginais e uretrais .....	40
6.6.8.1	Pesquisa de <i>Streptococcus agalactiae</i> em grávidas .....	41
6.6.9	Fezes.....	41
6.6.10	Amostras do Trato Respiratório .....	43
6.7	Pesquisa de Micobactérias.....	44
6.8	Teste Respiratório para o Diagnóstico e Monitorização Durante e Pós Tratamento na Infecção por <i>Helicobacter Pylori</i> .....	46
7	Controlo de Qualidade.....	47
7.1	Controlo de Qualidade Interno (CQI) .....	47
7.2	Controlo de Qualidade Externo (CQE).....	47
8	Conclusão .....	49
9	Bibliografia.....	50

## Índice de Figuras

**Figura 1:** Equipamento Triturus®.

**Figura 2:** Equipamento QUANTA - Lyser®.

**Figura 3:** Equipamento EUROBlotOne.

**Figura 4:** Equipamento BIO - FLASH®.

**Figura 5:** Equipamento ImmunoCAP250.

**Figura 6:** Algoritmo de Trabalho para Pesquisa de ANA.

**Figura 7:** Padrões de Fluorescência em Células Hep-2.

**Figura 8:** Algoritmo de Trabalho para a Pesquisa de Anticorpos Anti - dsDNA.

**Figura 9:** Padrão Característico de uma Amostra Positiva para dsDNA por IFI.

**Figura 10:** Algoritmo de Trabalho para a Determinação de ANCA:

**Figura 11:** Padrão de Fluorescência A - cANCA e B - pANCA.

**Figura 12:** Algoritmo de Trabalho para o Diagnóstico de Artrite Reumatoide.

**Figura 13:** Algoritmo de Trabalho para a Detecção de Anticorpos Antifosfolipídico.

**Figura 14:** Algoritmo de Trabalho para o Diagnóstico de Hepatites Autoimunes.

**Figura 15:** Algoritmo de Trabalho para o Diagnóstico de Doença Celíaca.

**Figura 16:** Padrão Anticorpos Anti - Endomísio por IFI.

**Figura 17:** Algoritmo de Diagnóstico para a Gastrite Autoimune e a Anemia Perniciosa.

**Figura 18:** Algoritmo para o Diagnóstico de Doença Inflamatória Intestinal.

**Figura 19:** Flora Comensal do Corpo Humano.

**Figura 20:** Equipamento BACTEC™ FX.

**Figura 21:** Equipamento VITEK® 2 Compact.

**Figura 22:** Equipamento Aerospray®.

**Figura 23:** Equipamento Sofia®.

**Figura 24:** Equipamento HeliprobeSystem®.

**Figura 25:** Coloração de Gram.

**Figura 26:** Coloração de Ziehl - Neelsen.

**Figura 27:** Carta de Identificação do Equipamento VITEK® 2 Compact.

**Figura 28:** Esfregaço de uma Amostra Positiva para BAAR.

**Figura 29:** Instruções do Teste para a Detecção de *Helicobacter pylori*.

## **Índice de Tabelas**

**Tabela 1:** Principais Doenças Autoimunes Sistémicas e os Anticorpos Associados.

**Tabela 2:** Imunoblots Disponíveis no SPC para Pesquisa de Doença Sistémica.

**Tabela 3:** Meios de Cultura Líquidos Utilizados no SPC da ULS da Guarda.

**Tabela 4:** Meios de Cultura Sólidos Utilizados no SPC da ULS da Guarda.

**Tabela 5:** Técnicas de Sementeira Utilizadas no SPC da ULS da Guarda.

**Tabela 6:** Teste de Orientação para Identificação de Microrganismos Utilizados no SPC da ULS da Guarda.

**Tabela 7:** Cartas de Identificação e Testes de Sensibilidade Microbiana usados no SPC da ULS da Guarda.

**Tabela 8:** Tabela de Murray e Washington

## **Abreviaturas**

**Ac.:** Anticorpo

**Ag.:** Antígeno

**AGH:** Antiglobulina Humana

**AMA:** Anticorpos Anti - Mitocondriais

**ANA:** Anticorpo Anti - Nuclear

**ANCA:** Anticorpo Anti - Citoplasma dos Neutrófilos

**Anti - LC:** Anticorpo Anti - Citosol do Fígado Tipo I

**AR:** Artrite Reumatoide

**ASCA:** Anticorpos Anti - *Saccharomyces cerevisiae*

**ATCC:** *American Type Culture Collection*

**BAAR:** Bacilo Álcool - Ácido Resistente

**BHI:** Caldo Coração - Cérebro

**CAM:** Gelose Campyloset

**CAN:** Gelose Candida

**CBP:** Cirrose Biliar Primária

**CCP:** Peptídeo Citrulinado Cíclico

**CE:** Colangite Esclerosante

**CLED:** Gelose *Cystine Lactose Electrolyte Deficient*

**CUMITECH:** *Cumulative Techniques and Procedures Clinical Microbiology*

**DCO:** Gelose D - Cocosel

**DMTC:** Doença do Tecido Conjuntivo

**EDTA:** Ácido Etilenodiamino Tetra - Acético

**EHEC:** *Escherichia coli* Enterohemorrágica

**EMA:** Anticorpos Anti - Endomísio

**EUCAST:** *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

**FEIA:** *Fluorescent Enzyme Immuno Assay*

**FITC:** Isocianato de Fluoresceína

**FR:** Fator Reumatoide

**Hep-2:** Células Epiteliais Humanas Tipo 2

**ICAP:** *International Consensus on Antinuclear Antibody Patterns*

**IFI:** Imunofluorescência Indireta

**IgG:** Imunoglobulina G

**ITU:** Infecção do Trato Urinário

**GAR:** Gelose *Gardenerella*  
**GC:** Gelose Chocolate  
**GCVCA:** Gelose Chocolate VCAT3  
**GRAN:** Gelose Granada  
**GS:** Gelose Sangue  
**LCR:** Líquido Cefalorraquidiano  
**LES:** Lupus Eritematoso Sistémico  
**LKM-I:** Anticorpos Anti - Microsomas do Fígado tipo-I  
**MCK:** Gelose *MacConkey*  
**MI:** Miopatia Inflamatória  
**MSA:** Gelose Manitol Salgado  
**MRSA:** Gelose *Staphylococcus aureus* Metilina Resistente  
**SAF:** Síndrome do Anticorpo Antifosfolípido  
**SGC:** Gelose Sabouraud Cloranfenicol Gentamicina  
**SMA:** Anticorpos Anti Músculo Liso de Actina  
**SPC:** Serviço de Patologia Clínica  
**SS:** Síndrome de Sjögren  
**TT:** Caldo Tetrionato  
**UFC:** Unidade Formadora de Colónias  
**ULS:** Unidade Local de Saúde  
**V:** Vasculite dos pequenos vasos  
**XLD:** Gelose Xilose - Lisina - Desoxicolato de Sódio  
**YER:** Gelose *Yersinia*

## **Resumo**

No âmbito do estágio curricular do Mestrado de Análises Clínicas, da Faculdade de Farmácia, da Universidade de Coimbra, que decorreu entre Janeiro 2022 e Julho 2022 no Serviço de Patologia Clínica da Unidade Local de Saúde da Guarda, foi-me possível desenvolver competências técnicas e científicas que me enriqueceram profissionalmente e pessoalmente.

No decorrer deste estágio, tive a oportunidade de trabalhar e adquirir conhecimentos em todas as áreas do laboratório, Bioquímica, Hematologia, Imunologia e Microbiologia. Este relatório aborda as fases pré analítica, analítica, pós-analítica e uma abordagem mais profunda sobre as áreas de Imunologia Clínica e Microbiologia.

Palavras-chave: Análises Clínicas; Imunologia; Microbiologia.

## **Abstract**

As part of the curricular internship of the Master of Clinical Analysis, Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, which took place between January 2022 and July 2022 at the Clinical Pathology Service of the Local Health Unit of Guarda, it was possible for me to develop technical and scientific knowledge that enriched me professionally and personally.

During this internship, I had the opportunity to work and acquire knowledge in all areas of the laboratory, Biochemistry, Hematology, Immunology and Microbiology. This report covers the pre-analytical, analytical, post-analytical phases and a deeper approach to the areas of Clinical Immunology and Microbiology.

Keywords: Clinical Analysis; Immunology; Microbiology.



## **I Introdução**

Com o avançar dos anos é cada vez mais notória a importância das análises clínicas no sistema de saúde. Os laboratórios de análises clínicas contribuem para um rápido diagnóstico de patologias, uma monitorização eficaz e um correto prognóstico.

Apostar no diagnóstico precoce da doença traz inúmeros benefícios, não só na melhoria da qualidade de vida dos utentes como também nos ganhos em Saúde.

O presente relatório de estágio descreve o trabalho realizado ao longo de 6 meses no Serviço de Patologia Clínica da Unidade Local de Saúde da Guarda no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Neste relatório destacam-se as áreas de Imunologia e Microbiologia descritas de uma forma mais detalhada e aprofundada. Também é descrita toda a dinâmica e processo laboratorial desde a fase pré-analítica até à fase pós-analítica.

## **2 O Serviço de Patologia Clínica**

A Unidade Local de Saúde da Guarda presta cuidados de saúde em vários concelhos: Almeida, Celorico da Beira, Figueira de Castelo Rodrigo, Fornos de Algodres, Gouveia, Guarda, Manteigas, Meda, Pinhel, Sabugal, Seia, Trancoso e Vila Nova de Foz Coa.

O Serviço de Patologia Clínica é um serviço de apoio à prestação de cuidados de saúde tanto numa vertente clínica como técnica, estando localizado na ULS da Guarda tendo um laboratório periférico no Hospital Nossa Senhora da Assunção em Seia.

O SPC da ULS Guarda, onde realizei o estágio, é constituído por 6 unidades laboratoriais:

Laboratório de Bioquímica

Laboratório de Biologia Molecular

Laboratório de Hematologia

Laboratório de Imunologia

Laboratório de Microbiologia

Laboratório de Micobacteriologia

Atualmente o SPC é dirigido pela Dra. Fátima Maria Madureira Vale e conta com vários colaboradores, 4 Farmacêuticos Especialistas, 2 Técnicos Superiores de Saúde, 3 Farmacêuticos Técnicos Superiores, 29 Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica, 5 Administrativos e 10 Assistentes operacionais (ULS Guarda, 2022).

## **2.1 Fase Pré Analítica**

A fase pré analítica representa um dos pontos-chaves mais importantes na área das análises clínicas, uma vez que dela depende a obtenção de resultados verdadeiros e fiáveis. Esta é a fase onde ocorre maior percentagem de erros que afetam tanto a fase analítica, como a pós-analítica na interpretação e validação de resultados, tendo, em alguns casos, consequências na avaliação clínica do utente.

Esta fase é formada por vários processos desde a marcação de exames, recolha de informação sobre o utente e a sua preparação, colheita e acondicionamento das amostras biológicas e transporte das mesmas para o laboratório.

Para que todos os erros sejam prevenidos ou minimizados os profissionais devem cumprir determinados procedimentos e regras para que todo o processo seja uniformizado.

## **2.2 Fase Pré Colheita**

Esta fase prende-se com o utente, este deve receber, do laboratório, escrito ou verbalmente, todas as informações sobre os cuidados a ter antes da realização da colheita, por exemplo, tempo de jejum, ingestão de medicamentos e bebidas alcoólicas, entre outras, que possam interferir com a qualidade da amostra. Outro processo muito importante na fase pré-colheita é a identificação, comprovar sempre os dados pessoais, e a criação do pedido no sistema informático para que seja atribuído um código de barras para cada tubo/amostra biológica e não haver extravio nem enganos.

Nesta fase é de salientar, também, que o prescritor deve descrever corretamente as análises que deseja assim como fornecer o maior número de informações sobre o utente para que na fase pós-analítica a interpretação dos resultados seja mais específica e correta.

### **2.2.1 Fase da colheita**

Uma vez criado o pedido no sistema informático com as análises pedidas, para minimizar erros, sairão apenas etiquetas com o código de barras e identificadas com o tubo/amostra necessário para a colheita. Exemplo: se necessitamos colher um tubo com anticoagulante sairá na etiqueta o tipo de tubo/tipo de anticoagulante, por exemplo se é “EDTA”. Se pedirem urina 24h sairá uma etiqueta que diga “Urina 24horas”, se for pedido pesquisa de colesterol sairá “Soro”.

Todas as amostras devem ser corretamente identificadas, colhidas nos frascos corretos e pela ordem correta, exemplo, o citrato e o EDTA são anticoagulantes que quando se

combinam com o cálcio causam diminuição deste analito no plasma, se for necessária colheita de soro esta deve ser feita antes para não correr o risco da contaminação.

As amostras devem ser transportadas para o laboratório o mais rápido possível, quando há atrasos ou as amostras vêm de fora do hospital (exemplo: dos centros de saúde) estas devem ser refrigeradas ou congeladas para evitar a perda de analitos mais instáveis. As falhas mais comuns nesta etapa são: amostra insuficiente, colheita feita em tubo inadequado, amostra inadequada para o pedido e identificação incorreta seja do utente ou da amostra.

### **2.2.2 Fase pós colheita**

As amostras chegam ao SPC devidamente acondicionadas, com etiqueta com o código de barras que vai acompanhar a amostra em todo o seu processamento.

As amostras dos Centros de Saúde são entregues pelos motoristas da ULS e vêm dentro de arcas com “loggers” (chip magnético) que permitem controlar a temperatura em todo o transporte.

Estas são triadas para as diferentes unidades do laboratório (bioquímica, hematologia, microbiologia, etc.) (Diário da República nº98, 2001).

## **3 Bioquímica**

A bioquímica clínica é a área das análises clínicas que faz a determinação de vários parâmetros bioquímicos que permitem auxiliar o diagnóstico, a monitorização do tratamento e da própria patologia e na prevenção da doença.

A área da bioquímica clínica no SPC da Guarda é, provavelmente, o sector mais automatizado de todo o SPC, conta com vários aparelhos automatizados como o Accelerator p540, o Alinity módulo C (química) e módulo I (imunoquímica), o Optilite, o Capillarys, o Vidas 3, o Sysmex® Série-UN e o Radiometer ABL 90 Flex (para gasometrias). Todos os dias, antes do início do turno todos os equipamentos são calibrados e controlados e são verificados todos os níveis de reagentes e consumíveis.

O Soro e a Urina são as amostras tipicamente processadas neste sector tal como o LCR e outros líquidos de derrame.

O Soro é a amostra onde são determinados a maioria dos parâmetros bioquímicos (ionograma, perfil hepático, perfil renal, metabolismo do ferro, proteínas séricas, drogas terapêuticas, perfil lipídico, perfil pancreático, marcadores cardíacos e tumorais serologia infecciosa, proteínas séricas, perfil endócrino, eletroforese de proteínas, etc.), é de extrema importância a verificação do frasco da colheita para analisar se tem amostra suficiente, se não

está hemolisado ou lipêmico etc., porque todos estes fatores podem afetar o resultado final da análise.

A urina também é uma amostra regularmente analisada neste sector e são determinados parâmetros da urina tipo II, urina 24h e pesquisa de drogas de abuso.

## **4 Hematologia**

A hematologia é o ramo da biologia que estuda o sangue de todos os animais, neste caso do Homem.

Neste setor, o SPC também conta com vários aparelhos automatizados, como o Sysmex para a realização dos hemogramas e esfregaços de sangue periférico, o ACL TOP 500 para a coagulação, o VesMatic 80 DIESSE para a velocidade de sedimentação e o TOSOH G8 para a determinação de hemoglobina glicada.

A amostra mais usada é o sangue total, mas também são processados líquidos, como o LCR, para a pesquisa de eritrócitos, leucócitos, polimorfonucleares e mononucleares muito importante para conseguir uma informação ao clínico mais rápida.

Neste setor são usadas principalmente amostras de sangue total colhidas em tubo com EDTA para a determinação do hemograma, da velocidade de sedimentação e da hemoglobina glicada, e sangue total colhido em tubo com citrato, que, após centrifugação é usado o plasma para a determinação de parâmetros da área da coagulação.

É de muita importância a verificação da presença de coágulos na amostra, se isso acontecer deve ser solicitada nova colheita, uma vez que os resultados vão ser errôneos.

## **5 Imunologia**

A Imunologia Clínica é uma área da biologia que estuda o sistema imunitário, sendo este um sistema complexo que tem como principal função a defesa do hospedeiro.

O sistema imunitário é constituído pelo sistema imunitário inato e pelo sistema imunitário adquirido. O sistema imunitário inato é constituído por barreiras anatómicas e respostas celulares contra a infeção. As barreiras anatómicas físicas são a primeira linha de defesa, previnem que os microrganismos infecciosos entrem no organismo. As respostas celulares são respostas rápidas, não específicas que são desencadeadas por padrões moleculares conservados e associados aos agentes patogénicos, reconhecidos pelos fagócitos.

Alguns patogénicos têm a capacidade de escapar a resposta inata, sendo necessária uma resposta mais especializada e efetiva, como é o caso do sistema imunitário adquirido. Este sistema imunitário é constituído pela imunidade humoral e imunidade celular. A imunidade

humoral é constituída por anticorpos produzidos pelos plasmócitos e a imunidade celular é mediada por linfócitos T (Owen et al., 2013).

No sector de imunologia faz-se pesquisa de vários parâmetros de imunologia que compreende as autoimunidades e a alergologia.

Ao longo deste relatório vão ser descritas as várias metodologias e procedimentos realizados durante o estágio neste setor.

## 5.1 Equipamentos

Triturus® – é um analisador ELISA totalmente automatizado que realiza testes para monitorização de doenças infecciosas, autoimunes e medicamentos biológicos.



**Figura 1:** Equipamento Triturus®.

QUANTA – Lyser® 3000 – é um processador de lâminas de imunofluorescência indireta.



**Figura 2:** Equipamento QUANTA – Lyser®.

EUROBlotOne – é um analisador de Western Blot automático para processamento de imunoblots.



**Figura 3:** Equipamento EUROBlotOne.

BIO - FLASH<sup>®</sup> – é um analisador de quimioluminescência para deteção de doenças autoimunes.



**Figura 4:** Equipamento BIO-FLASH<sup>®</sup>.

ImmunoCAP250 – é um equipamento que permite a realização de testes de alergias e autoimunidades pelo método FEIA.



**Figura 5:** Equipamento ImmunoCAP250.

## 5.2 Metodologias

ELISA – é um imunoensaio para a deteção e quantificação de anticorpos e antigénios, este método utiliza microplacas que contêm no seu interior, numa fase sólida, antigénios/anticorpos específicos, que ao entrarem em contacto com a amostra formam

imunocomplexos que vão ser detetados enzimaticamente por um conjugado (Antiglobulina Humana (AGH) conjugada a uma enzima), que ao degradar o substrato que é incolor forma uma solução com cor que é proporcional à quantidade de anticorpo ou antigénio presente na amostra. Esta quantificação é realizada por fotometria.

Imunofluorescência indireta (IFI) – esta técnica utiliza lâminas que estão impregnadas com os antigénios que são complementares aos anticorpos que se pretendem detetar nas amostras. O soro do doente é previamente diluído e adicionado à lâmina, se tiver anticorpos estes vão sensibilizar os antigénios que estão impregnados na lâmina. São feitas lavagens para remover anticorpos inespecíficos e no fim é adicionado um conjugado (AGH conjugada com um fluorocromo – FITC (isotiocianato de fluoresceína)) que vai formar um imunocomplexo. As lâminas são depois observadas por microscopia de fluorescência.

Western Blot – utiliza tiras de nitrocelulose que contem antigénios. A amostra após diluição é colocada em contacto com as tiras, se tiver anticorpos vão-se ligar aos antigénios das tiras, os que não se ligam são removidos através de lavagem das tiras. Após esta lavagem é adicionado um conjugado (AGH conjugado a uma enzima) que vai formar o imunocomplexo que após a adição do substrato forma um composto colorido.

Quimioluminescência – esta técnica utiliza uma fase sólida de micropartículas paramagnéticas que estão revestidas com antigénio. O soro vai entrar em contacto com as partículas paramagnéticas e ocorre uma reação antigénio - anticorpo. O imunocomplexo específico formado é separado através de magnetismo que será detetado após a adição de um conjugado (AGH conjugado a uma enzima) que sofre um passo de lavagem e de adição dos reagentes que despoletam a reação luminescente originando assim uma emissão de luz que será proporcional a concentração do analito.

FEIA (*Fluorescence Enzyme Immuno Assay*) – este ensaio usa uma fase sólida (celulose) na qual está acoplado covalentemente o antigénio de interesse que irá reagir com os anticorpos correspondentes da amostra, dá-se uma reação antigénio - anticorpo, os que não se ligam são removidos por uma lavagem. Após esta lavagem é adicionado um conjugado (AGH marcados com uma enzima) que forma o imunocomplexo e depois é lida a fluorescência resultante.

### **5.3 Doenças Autoimunes**

Uma das características mais notáveis do sistema imunitário é a sua capacidade de reconhecer antigénios estranhos ao próprio organismo, desencadeando uma resposta imunitária com a finalidade de proteger o hospedeiro. A incapacidade de distinguir entre

antígenos estranhos e antígenos do próprio organismo resulta por vezes na destruição de células e órgãos do hospedeiro, um processo denominado de autoimunidade.

Nas doenças autoimunes há destruição de proteínas, células e órgãos do hospedeiro por autoanticorpos ou células T auto - reativas. Por isso, estas doenças são categorizadas como específicas de órgãos ou sistêmicas, dependendo se afetam um único órgão ou múltiplos sistemas do organismo (Owen et al., 2013).

Normalmente são realizados vários exames laboratoriais até chegar a um diagnóstico.

O tratamento depende do tipo de doença autoimune, mas frequentemente inclui fármacos inibidores do sistema imunológico.

### 5.3.1 Doenças autoimunes sistêmicas

As doenças autoimunes sistêmicas são caracterizadas pelo aparecimento de autoanticorpos contra componentes celulares que estão distribuídos por todo o organismo. As principais são doenças do tecido conjuntivo e algumas vasculites.

Há vários anticorpos associados a doenças sistêmicas como podemos observar na tabela I.

**Tabela I:** Principais Doenças Autoimunes Sistêmicas e os Anticorpos Associados.

<b>Anticorpo</b>	<b>Doenças Autoimunes Sistêmicas</b>
ANA	LES; SS; ES; MI; AR; SAF; DMTC; CBP; CE
Anti - dsDNA	LES; SS; SAF
Anti - Nucleossomas	LES
Anti - Sm	LES; SS
Anti U - RNP	LES; SS; MI
Anti - RoS2	LES; SS; ES
Anti - SSA/SSB	SS; LES
Anti - Ribossomal - P Protein	LES
Anti - Ku	LES; MI
Fator Reumatoide	SS; AR; LES; SS
Anti - centrómero	ES
Anti - Set - 70	ES
Anti - RNA - Pol - III	ES
Anti - Jo-1 Anti - Mi-1 Anti - Mi-2	MI
ANCA Anti - MPO, PRE	V, CE

Anti - GBM	V
Anti – Citrulinado Cíclico (CCP)	AR
Anticoagulante Lúpico (AL) Anti - Cardiolipina (IgG/IgM) Anti - $\beta$ 2 Glicoproteína I (IgG/IgM)	SAF
Anti - Mitocôndrias (AMA) Anti - Mitocôndrias (tipo2)	CBP

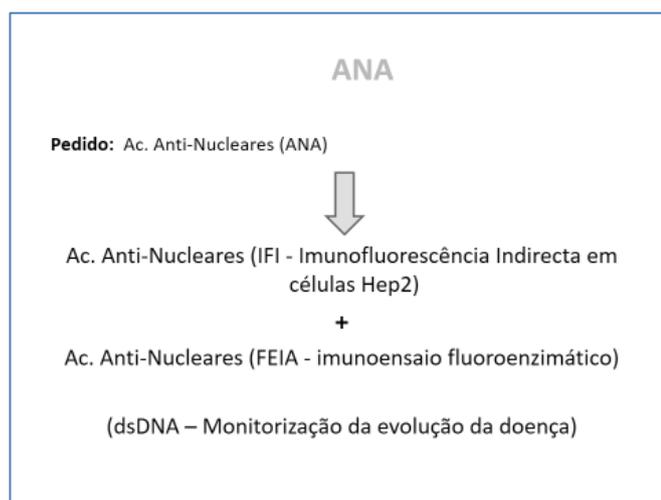
### 5.3.1.1 Anticorpo Anti - Nuclear (ANA)

A pesquisa destes autoanticorpos é essencial no diagnóstico, monitorização e classificação das doenças autoimunes. O primeiro passo para a pesquisa de autoanticorpos é a IFI porque é uma técnica muito sensível e específica.

A técnica IFI permite a semi - quantificação de autoanticorpos presentes na amostra de soro do utente. Nesta técnica estão fixados na lâmina antígenos de Células Epiteliais Humanas Tipo 2 (Hep-2) ao qual se ligam os anticorpos e vão dar origem a um padrão de fluorescência específico. Os resultados obtidos por IFI são expressos em títulos de diluição (a maior diluição na qual a amostra é positiva). Inicialmente, a pesquisa de anticorpos anti - nucleares em adultos é feita 1:160 e em amostras pediátricas 1:80 (Chan et al., 2015).

A nomenclatura dos padrões de fluorescência observados por IFI segue a nomenclatura ICAP (*International Consensus on Antinuclear Antibody Patterns*).

A pesquisa laboratorial de anticorpos anti - nucleares é feita com base no algoritmo representado na figura 6.



**Figura 6:** Algoritmo de Trabalho para Pesquisa de ANA.

No SPC faz-se em simultâneo a pesquisa de anticorpos por IFI e FEIA aumentando assim a capacidade de diagnóstico. Com a realização de IFI e a observação microscópica de padrões de fluorescência, como são exemplo os da figura 7, é possível distinguir e caracterizar diferentes estruturas celulares e adicionalmente a esta pesquisa faz-se um *screening* por FEIA, uma vez que é possível encontrar falsos negativos por IFI, uma vez que há antígenos muito solúveis (SSA/Ro) e antígenos expressos em baixas concentrações (Jo - 1). Também é possível encontrar falsos negativos por FEIA, uma vez que neste método temos antígenos selecionados e adicionados à fase sólida, enquanto que, por IFI temos células Hep2 que contém todos os antígenos celulares.

Este *screening* inicial contém os antígenos seguintes: dsDNA, UIRNP, (RNP70, A, C), SS-A/Ro (60 kDa, 52 kDa), SS-B/La, Centrómero B, Scl-70, Jo-1, Fibrilarina, RNA Pol III, Rib-P, PM-Scl, PCNA, Proteínas Mi-2, Proteínas Sm. Caso este *screening* seja positivo faz-se a pesquisa individual dos anticorpos específicos tendo em conta o tipo de padrão visualizado.

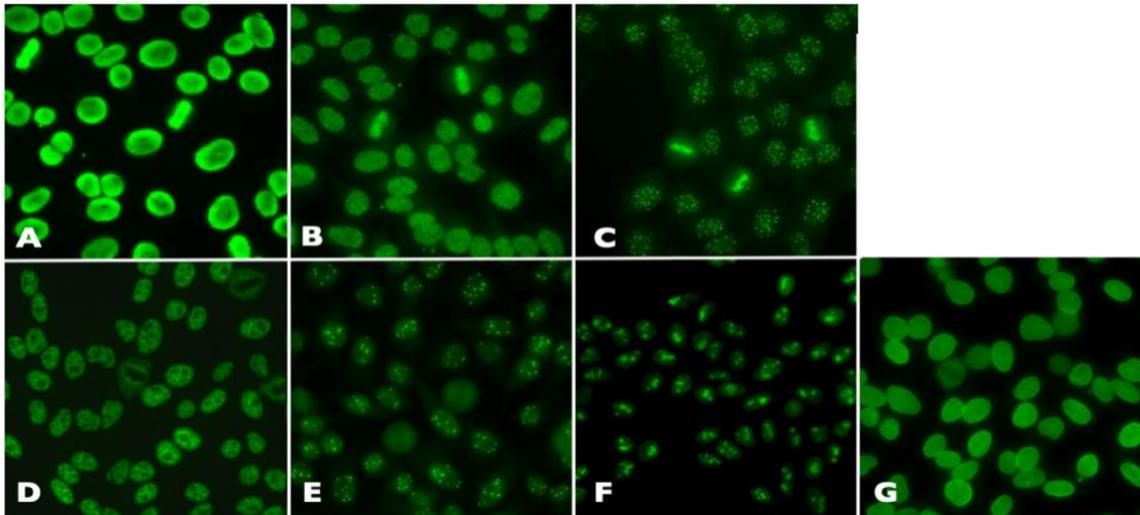
Há casos em que a IFI dá positivo e o *screening* inicial por FEIA negativo, nestes casos realizam-se testes diferenciais por imunoblot consoante o padrão de fluorescência obtido. Estes imunoblots possuem painéis alargados de antígenos que não se encontram no *screening* inicial. Mediante o padrão observado é escolhido o imunoblot a realizar.

Os painéis disponíveis para realização de imunoblot estão representados na tabela 2.

**Tabela 2:** Imunoblots Disponíveis no SPC para Pesquisa de Doença Sistémica.

<b>Miosites</b>	<b>Esclerose Sistémica</b>	<b>Doenças Hepáticas Autoimunes</b>	<b>Blot ANA</b>
EJ	CENP A	AMA BPO	RNP/Sm
Jo-1	CENP B	AMA-M2	Sm
Ku	Fibrilarin	Gp210	SSA
Mi-2	Ku	LCI	Ro-52
OJ	NOR90	LKMI	SSB
PL-12	PDGFR	PML	SCL-70
PL-7	RPI I	Ro-52	PM-SCL
Scl-75	RPI55	SLA/LP	Jo-1
Scl-100	Ro-52	Sp100	CENP B
SRP	Scl-70		PCNA
Mi-2 $\beta$ ,	Scl-75		dsDNA
Mi-2b	Scl-100		Nucleossomas
TIF Ig	Th/To		Histonas
MDA5			Ribossoma P

NXP2			AMA m2
SAEI			DFS70

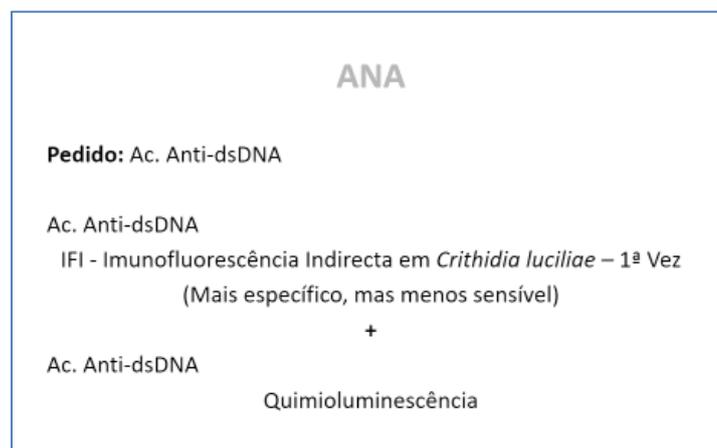


**Figura 7:** Padrões de Fluorescência em Células Hep-2. A – Padrão homogêneo, B – Padrão finogranular denso, C - Padrão centrómero, D – Padrão mosqueado, E – Padrão múltiplos pontos nucleares, F – Padrão nucleolar homogêneo e G – Padrão membrana nuclear.

### 5.3.1.2 Anticorpo Anti - dsDNA

A pesquisa de autoanticorpos anti - *double - stranded* DNA utiliza como substrato a *Crithidia luciliae*, um hemoflagelar, este protozoário tem um cinetoplasto que é uma mitocôndria que contem uma grande quantidade de dsDNA muito condensado, logo quando se ligam os anticorpos a fluorescência neste cinetoplasto é muito significativa o que torna o ensaio altamente específico (Gerlach et al., 2015).

O algoritmo laboratorial para a pesquisa deste Anti - dsDNA está representado na figura 8.



**Figura 8:** Algoritmo de Trabalho para Pesquisa de Anticorpos Anti - dsDNA.

Em simultâneo é feita a observação por IFI do padrão característico (Figura 9) e realizado por método de quimioluminescência a pesquisa de Ac. Anti - dsDNA.



**Figura 9:** Padrão Característico de uma Amostra Positiva para dsDNA por IFI.

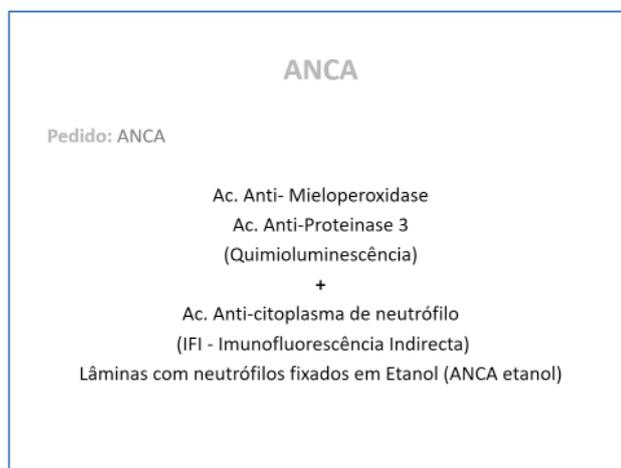
Estes autoanticorpos são muito importantes para o diagnóstico de Lupus Eritematoso Sistêmico e assumem ainda uma relação com a atividade da doença, uma vez que doentes com LES devem quantificar os títulos de dsDNA com uma frequência de 6 a 12 semanas de forma a controlarem a atividade da doença.

### **5.3.1.3 Anticorpo Anti - Citoplasma dos Neutrófilos (ANCA)**

Estes autoanticorpos são importantes biomarcadores no diagnóstico de vasculites (inflamação sistêmica e necrose dos vasos sanguíneos).

Estes autoanticorpos são produzidos contra os componentes citoplasmáticos dos neutrófilos, em particular, os constituintes dos grânulos. Estão divididos em dois grupos MPO (anticorpos anti - mieloperoxidase) e PR3 (anticorpos anti - proteinase).

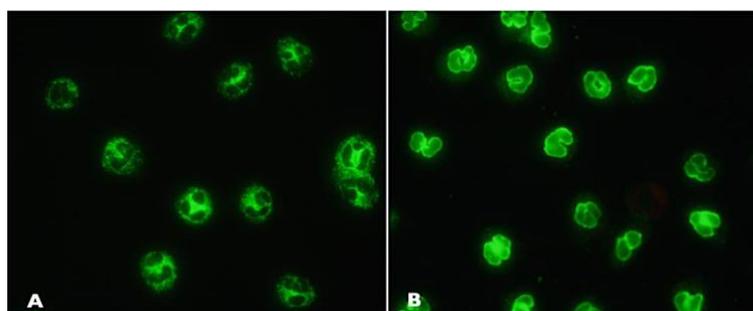
A pesquisa laboratorial dos ANCA segue o algoritmo da figura 10, há primeiro uma pesquisa por quimioluminescência de MPO e PR3, que é um método rápido e permite uma resposta em tempo útil ao clínico, sempre que há resultados positivos o serviço contacta de imediato o clínico.



**Figura 10:** Algoritmo de trabalho para a determinação de ANCA.

Em alternativa aos ensaios por quimioluminescência, são efetuados ensaios por IFI. Este ensaio usa lâminas fixadas com neutrófilos fixados em etanol e cuja diluição inicial é 1:20.

Os ANCA apresentam mais frequentemente dois padrões, como podemos observar na figura 11. O padrão citoplasmático (cANCA), que está normalmente relacionado com a presença de autoanticorpos Anti - PR3 associado a um diagnóstico de granulomatose com poliangite. O segundo padrão é perinuclear (pANCA), apresenta fluorescência em torno do núcleo multi - lobulado, está associado à presença, maioritariamente, de anticorpos Anti - MPO.



**Figura 11:** Padrão de Fluorescência A - cANCA e B - pANCA.

É importante referenciar se o padrão observado é citoplasmático ou perinuclear, uma vez que este último está associado a outras patologias como colite ulcerosa, doença de Crohn, hepatite crónica, artrite reumatoide e LES.

Há padrões de ANCA atípicos, os cANCA atípicos não parecem ter significado clínico, mas os pANCA atípicos aparecem em várias doenças como a doença inflamatória intestinal, artrite reumatoide e alguns tipos de vasculite induzida por drogas. Como teste complementar na pesquisa de ANCA utilizamos um painel de antígenos por técnica de ELISA que contem MPO, PR3, lactoferrina, elastase, catepsina e o BPI (Buitrago, 2000; Salvador, 2020).

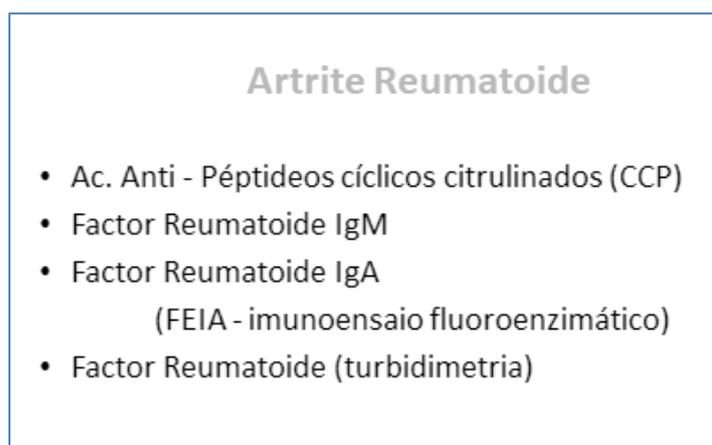
#### 5.3.1.4 Anticorpo Anti - Fator Reumatoide e Anti - Peptídeo Citrulinado Cíclico

A artrite reumatoide é uma doença crónica, inflamatória e autoimune que se caracteriza pela inflamação, principalmente, das articulações periféricas (mãos, pés, joelhos ombros e pescoço) e que pode conduzir à sua destruição.

Causa a perda da forma e do alinhamento das articulações resultando em dor e inchaço podendo levar à incapacidade (Buitrago, 2000).

A presença de autoanticorpos como o FR e o CCP podem anteceder as manifestações clínicas da doença entre 6 ou mais anos. As alterações estruturais que podem ser observadas por técnicas imagiológicas são normalmente inexistentes nas primeiras fases da doença, daí o diagnóstico laboratorial ser essencial uma vez que o início precoce do tratamento previne o dano articular e, portanto, melhora o prognóstico da doença (Tozzoli et al., 2002).

O diagnóstico segue o algoritmo da figura 12 e compreende a determinação por FEIA do CCP do FR IgM e IgA e ainda a deteção do FR por turbidimetria (feita no setor da bioquímica).

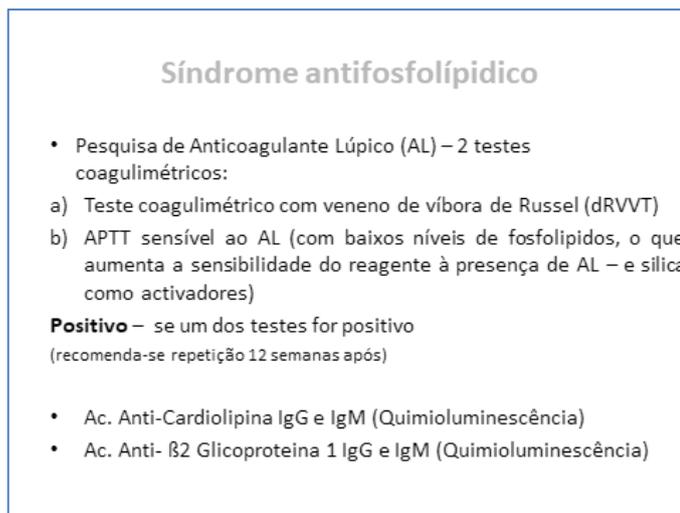


**Figura 12:** Algoritmo de Trabalho para o Diagnóstico de Artrite Reumatoide.

#### 5.3.1.5 Anticorpo Anti - Cardiolipina e Anti $\beta$ 2 - Glicoproteína

A síndrome do anticorpo antifosfolipídico é uma doença autoimune na qual os utentes têm autoanticorpos contra as proteínas ligadas aos fosfolipídios, podendo dar origem a trombose arterial ou venosa, trombocitopenia, morte fetal e abortos espontâneos recorrentes.

Os testes laboratoriais para a deteção de anticorpos antifosfolipídico incluem ensaios que detetam anticorpos anti – cardiolipinas, o anticoagulante lúpico e anticorpos anti  $\beta$ 2 – glicoproteína seguindo o protocolo da figura 13.



**Figura 13:** Algoritmo de Trabalho para a Detecção de Anticorpos Antifosfolípídico.

#### 5.4 Doenças Hepáticas Autoimunes

As doenças hepáticas autoimunes são um grupo de doenças autoimunes cujos alvos de agressão são os hepatócitos e os ductos biliares. As que mais se destacam são as hepatites autoimunes 1 e 2 e a cirrose biliar primária.

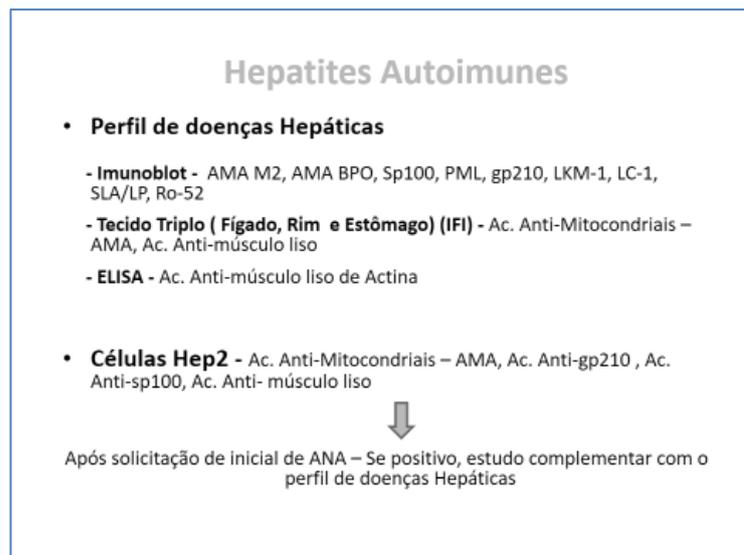
A hepatite autoimune tipo 2 aparece em crianças dos 2 aos 14 enquanto a hepatite autoimune tipo 1 aparece entre os 16 e 30 anos.

Os testes específicos para a hepatite autoimune tipo 1 são os anticorpos ANA e os anticorpos anti músculo liso de actina (SMA), para a hepatite autoimune tipo 2 os testes mais específicos são os anticorpos anti – microssomas do fígado tipo 1 (LKM - 1) e anti – citosol do fígado tipo 1 (anti - LC1).

Há marcadores conjuntos de ambas as doenças como por exemplo a pesquisa de anti – antigénios solúveis do fígado e pâncreas (SLA/LP) que está associado a um mau prognóstico da doença.

A cirrose biliar hepática está caracterizada pela presença de anticorpos anti mitocondriais (AMA) (Bogdanos et al., 2008).

O diagnóstico é feito com base no algoritmo da figura 14.



**Figura 14:** Algoritmo de Trabalho para o Diagnóstico de Hepatites Autoimunes.

A técnica recomendada para *screening* das doenças hepáticas autoimunes é a IFI Tecido Triplo que são lâminas que têm células de rato do fígado, rim e estômago que permite a detecção de todos os anticorpos acima referidos.

Como se utilizam as células de Hep-2 para detecção de outras doenças por vezes encontram-se padrões característicos das hepatites autoimunes como o padrão múltiplos dots nucleares, quando isto acontece é feito um estudo complementar com o perfil hepático.

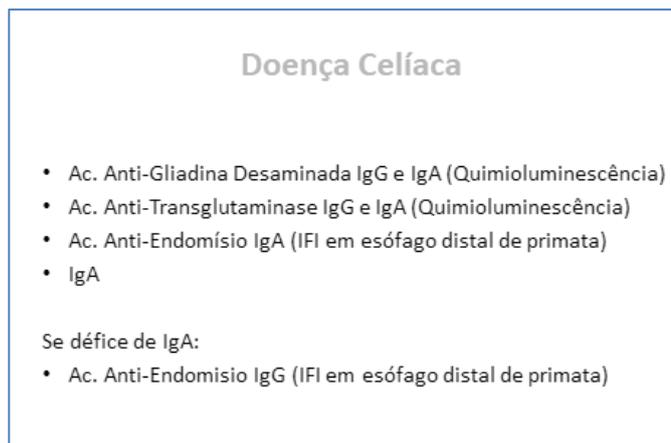
É importante ter cuidado com os resultados positivos uma vez que isso pode acontecer na presença de outras doenças como: hepatites virais crônicas B, C e D, falha hepática aguda, hepatite induzida por drogas, esteato - hepatite não alcoólica, doenças do fígado induzidas pelo abuso de álcool, carcinoma hepatocelular e uma grande variedade de outras doenças não relacionadas com o fígado, pelo que os resultados devem ser sempre interpretados em contexto clínico (Bogdanos et al., 2008).

## 5.5 Doença Celíaca

A doença celíaca é uma condição autoimune causada pela intolerância ao glúten que é uma proteína que se encontra principalmente em cereais como o trigo, aveia, cevada, centeio, entre outros.

Os principais sintomas são dor abdominal, diarreia e flatulência.

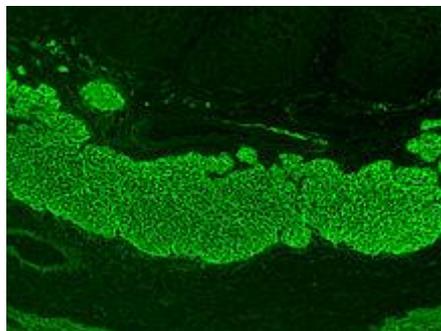
O diagnóstico é feito com base da figura 15.



**Figura 15:** Algoritmo de Trabalho para o Diagnóstico de Doença Celíaca.

No setor de imunologia é feita a determinação de anticorpos anti - transglutaminase (IgA e IgG), anticorpos anti – gliadina (IgA e IgG) por quimioluminescência e determinação dos anticorpos anti endomísio (EMA) por IFI (IgA), estas lâminas estão preparadas com secções de esófago de macaco e os anticorpos reagem contra a substância que envolve as miofibrilas da musculatura lisa formando um padrão que podemos observar na figura 16.

No setor de bioquímica é feita a pesquisa de IgA total para perceber se há deficiência ou não, se houver deficiência, a pesquisa de EMA é feita, também, no sentido de identificar anticorpos de classe IgG.

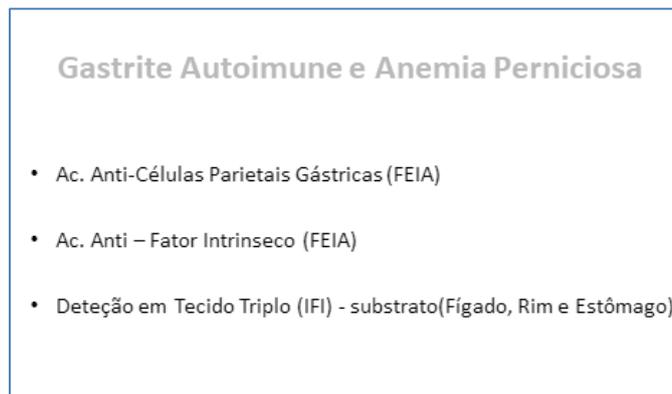


**Figura 16:** Padrão Anticorpos Anti – Endomísio por IFI.

### **5.6 Gastrite Autoimune e Anemia Perniciosa**

A gastrite autoimune consiste numa doença autoimune que ataca as células parietais causando hipocloridria e diminuição da produção do fator intrínseco. As consequências são gastrite crónica e anemia perniciosa causada pela má absorção da vitamina B12. O risco de carcinoma gástrico está aumentado em 3 vezes e o tratamento consiste em administração parenteral de vitamina B12 (Andres & Serraj, 2012).

O algoritmo de diagnóstico está apresentado na figura 17.



**Figura 17:** Algoritmo de Diagnóstico para a Gastrite Autoimune e a Anemia Perniciosa.

### 5.7 Doença Inflamatória Intestinal

A doença inflamatória intestinal é uma condição na qual o intestino se torna mais avermelhado, irritado, inchado e com presença de úlceras; pode ser classificada em dois tipos principais: Doença de Crohn e Colite ulcerosa. A maior diferença entre as duas é que na doença de Crohn todo o trato digestivo, desde a boca até ao ânus pode ficar afetado e na colite ulcerosa os sintomas são mais restritos ao cólon e reto.

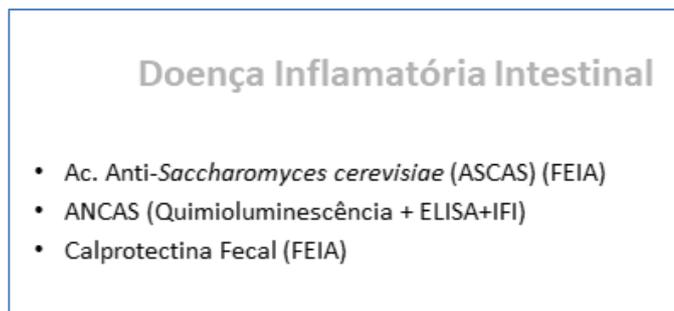
A pesquisa de anticorpos *anti - Saccharomyces cerevisiae* (IgA e IgG) (ASCA) por IFI permite em conjunto com os resultados pANCA e calprotectina fecal orientar o diagnóstico.

Um resultado pANCA positivo e ASCA negativo orienta ao diagnóstico de colite ulcerosa, na doença de Crohn é mais comum encontrar um ASCA positivo e um pANCA negativo.

A calprotectina é uma proteína que se encontra nas células humanas que estão envolvidas na defesa contra os patogénicos, nos granulócitos dos neutrófilos esta proteína está presente em 60% das proteínas do citosol.

Na doença inflamatória intestinal estes neutrófilos migram para a luz intestinal, o que vai resultar num elevado nível de calprotectina nas fezes. Este nível de calprotectina nas fezes tem correlação com o número de granulócitos neutrófilos que se encontram no intestino e que está especialmente elevado nas doenças inflamatórias intestinais daí ser um marcador de monitorização (Suwanchote et al., 2018).

O algoritmo de diagnóstico da doença inflamatória intestinal está apresentado na figura 18.



**Figura 18:** Algoritmo para o Diagnóstico de Doença Inflamatória Intestinal.

## 5.8 Alergologia

A alergologia ou imunoalergologia é um ramo da imunologia que estuda e diagnostica a doença alérgica.

A doença alérgica atinge, atualmente, um número elevado de pessoas e a tendência é o aumento deste número. Embora não haja uma justificativa para a prevalência desta doença, os agentes externos considerados mais importantes incluem os próprios alérgenos, as infecções, a poluição atmosférica e os hábitos de vida, também a predisposição genética é considerada um fator importante.

Os testes laboratoriais de diagnóstico da doença alérgica, são uma ferramenta muito importante porque permitem a identificação dos doentes sensibilizados e monitorizar a evolução da doença e da terapêutica. Estes testes permitem a identificação do alérgeno e por conseguinte permitem a criação de estratégias para a evicção do alérgeno, que, hoje em dia, continua a ser a solução mais eficaz para prevenir reações alérgicas (Owen et al., 2013).

### Quantificação da IgE total

A IgE é uma imunoglobulina que normalmente é encontrada na superfície de algumas células do sangue, principalmente basófilos e mastócitos que aparecem em maior quantidade nas reações alérgicas.

O primeiro teste a ser realizado é a quantificação da IgE total que em conjunto com outros indicadores clínicos fornece informação útil para o diagnóstico de uma reação alérgica. Assim, níveis elevados de IgE total no soro significam que estamos perante uma reação alérgica do tipo I.

### Quantificação IgE específica

A quantificação de IgE específica permite a procura dirigida do antígeno quando o clínico suspeita de um antígeno específico, como por exemplo o pelo do gato.

Para a quantificação da IgE específica podem ser usados IgE múltiplos para vários alérgenos de forma conjunta, no SPC usamos alguns:

- Pedidos de alérgenos alimentares: há uma pesquisa inicial, um *screening* multialimentar (clara de ovo, leite de vaca, bacalhau, trigo, amendoim e grão de soja) que contém os principais alérgenos associados a alergias alimentares, se este *screening* der positivo, então realiza-se a determinação dos alérgenos específicos. No caso de pedidos de alergia ao leite e ao ovo considera-se importante a realização da determinação das proteínas específicas do leite bem como da clara e da gema do ovo para o médico conseguir recomendar a evicção do alimento de forma mais específica.

- Pedidos de alérgenos inalantes: há, também, neste caso um *screening* inicial com um multi - inalante (multi - rast árvores, multi - rast epitélios, multi - rast ervas, multi - rast fungos e multi - rast gramíneas) e só em caso de positividade se procede à determinação dos antigénios específicos.

Outros alérgenos não contidos neste *screening* são pedidos diretamente pelo clínico.

## **6 Microbiologia**

A Microbiologia é a área da Biologia que estuda os microrganismos. Os microrganismos são seres vivos de dimensões microscópicas e estão divididos em quatro grupos: bactérias, fungos, parasitas e vírus.

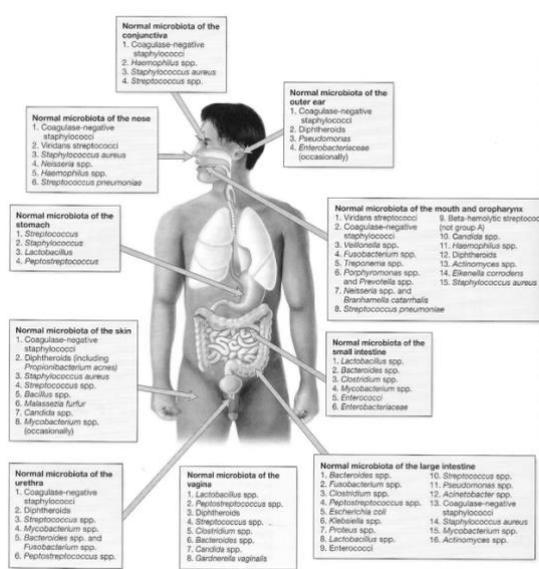
A Microbiologia Clínica é uma área complexa, uma vez que, são milhares os microrganismos que vivem dentro de nós e no nosso entorno, que nos podem causar doenças sérias. É, também, uma ciência dinâmica, em constante mutação pois estes microrganismos são seres vivos com uma ótima capacidade de adaptação, o que faz com que os antibióticos que no passado eram eficientes contra determinados microrganismos sejam hoje ineficazes.

No setor de Microbiologia da ULS da Guarda faz-se pesquisa e isolamento de microrganismos capazes de causar infeção, sendo o foco as bactérias, os fungos e os parasitas. O estudo dos vírus é feito no setor da Biologia Molecular e na Imunoquímica é feita a deteção de anticorpos e antigénios específicos.

Ao longo deste relatório vão ser descritas as várias metodologias e procedimentos realizados durante o estágio neste setor.

No sector de Microbiologia da ULS da Guarda todos os dias são analisadas diversas amostras biológicas e para uma correta avaliação das mesmas temos de ter em consideração, que, o nosso organismo é colonizado por diversos microrganismos, a que chamamos microbiota comensal. Esta microbiota comensal é muito diversificada e numerosa como podemos observar na figura 19, coloniza a pele, as mucosas e os aparelhos respiratório, intestinal, reprodutor e urinário. A maioria destes microrganismos são bactérias (Murray et al., 2020).

Portanto, o conhecimento desta microbiota comensal é essencial para a análise dos produtos biológicos que chegam ao laboratório.



**Figura 19:** Flora comensal do corpo humano.

## 6.1 Equipamentos

No laboratório de microbiologia existem os seguintes equipamentos:

**BACTEC™ FX** – é um sistema de detecção automatizado de incubação, agitação e monitorização de hemoculturas. Deteta a existência de microrganismos pela produção de CO<sub>2</sub> que os microrganismos vão metabolizar através do substrato presente no meio.



**Figura 20:** Equipamento BACTEC™ FX.

**VITEK® 2 Compact da Biomerieux®** – é um sistema automatizado de identificação de bactérias e leveduras e os respetivos testes de sensibilidade aos antimicrobianos. A identificação e os antibiogramas são executadas através da monitorização contínua do crescimento e atividade no interior das cartas.



**Figura 21:** Equipamento VITEK® 2 Compact.

Aerospray® Gram e Aerospray® TB – são aparelhos de corar lâminas, utilizados na coloração de Gram e Auramina, respetivamente.



**Figura 22:** Equipamento Aerospray®.

Sofia® – é um sistema automatizado para pesquisa de *Legionella pneumophila* e *Streptococcus pneumonia* na urina através de imunofluorescência.



**Figura 23:** Equipamento Sofia®.

HeliprobeSystem® – é um sistema que utiliza radiação para a deteção de *Helicobacter pylori* através de um Teste Respiratório não invasivo com Ureia marcada com  $^{14}\text{C}$ .



**Figura 24:** Equipamento HeliprobeSystem®.

## 6.2 Exames Microscópicos Diretos – Técnicas de Coloração

O exame microscópico direto, permite, de uma forma rápida, através das características morfológicas dos microrganismos (forma, tamanho, afinidade pelos corantes, etc.) fazer um diagnóstico presuntivo que pode ser disponibilizado ao clínico como provisório até ser obtido um resultado final, que na microbiologia, com tempos de crescimento de culturas, seleção de meios e microrganismos, pode ser demorado.

Este exame microscópico direto pode ser feito a fresco (diretamente da amostra) ou após coloração de Gram, de Leishman, de Ziehl - Neelsen e Auramina (Tille, 2022).

### 6.2.1 Coloração de Gram

A coloração de Gram, representada na figura 25, é realizada para diferenciar a morfologia das bactérias (bacilos ou cocos) e se estas são Gram - positivas ou Gram - negativas, ao microscópio ótico.

Neste laboratório, a coloração de Gram é feita automaticamente no Aerospray® Gram. O princípio desta coloração baseia-se na constituição química das paredes das bactérias. Ao possuírem uma camada externa com grande concentração de peptidoglicano, as bactérias Gram - positivas retêm o corante primário (cristal violeta), mantendo uma cor azul/roxa. Já as bactérias Gram - negativas possuem uma menor quantidade de peptidoglicano, lipoproteínas e outras proteínas, sofrendo por isso descoloração, uma vez que o solvente lipídico dissolve a porção lipídica da membrana externa destas bactérias, e incorporam o corante secundário (safranina), adquirindo uma coloração rosa/vermelho. O diferenciador também desidrata a parede das bactérias Gram-positivas fazendo com que poros do peptidoglicano se contraíam e assim mantêm a cor azul/roxa.



Figura 25: Coloração de Gram.

### 6.2.2 Coloração de Leishman

A coloração de Leishman, tem como objetivo, avaliar a qualidade das amostras, visualizar células epiteliais e leucócitos e identificar alguns parasitas como o *Trypanosoma spp* e o *Plasmodium spp*. Esta coloração utiliza três reagentes, o metanol, para a fixação, a eosina, para corar o citoplasma, e o azul de metileno, para corar o núcleo das células. A sua execução é feita imergindo as lâminas nestes três reagentes.

### 6.2.3 Coloração de Ziehl - Neelsen

A coloração de Ziehl – Neelsen, representada na figura 26, é utilizada para a pesquisa de bacilos álcool – ácido resistentes (BAAR), nomeadamente, micobactérias. Esta propriedade das bactérias é lhes conferida devido ao alto teor de lípidos na sua parede celular. Esta técnica é maioritariamente utilizada quando há suspeita de tuberculose. A sua realização é efetuada manualmente, a quente ou a frio, cobrindo a lâmina com os reagentes.

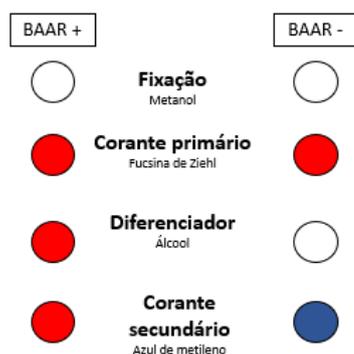


Figura 26: Coloração de Ziehl - Neelsen.

### 6.2.4 Coloração de Auramina O

Tal como a coloração de Ziehl - Neelsen, a coloração de Auramina O é útil para a identificação de micobactérias. Este corante possui fluorocromos com grande afinidade para as micobactérias, o que leva à ligação do corante com as bactérias. As micobactérias são então visualizadas com uma fluorescência amarelada num fundo negro. A sua realização é efetuada no equipamento Aerospray® TB automaticamente.

## 6.3 Exame Cultural – Meios de Cultura

Após a realização do exame direto são selecionados os meios de cultura. Os meios usados para a sementeira dependem do tipo de amostra e do pedido do clínico.

Os meios de cultura são constituídos por substratos que permitem a nutrição e o crescimento de microrganismos. A sua composição consiste principalmente em água, numa

fonte de energia, em elementos químicos, fatores de crescimento, substâncias inibidoras, indicadores de pH e substâncias solidificantes.

Cada meio e cada microrganismo têm as suas condições de incubação próprias e estas diferem na temperatura (psicrófilos, mesófilos e termófilos), no pH (acidófilos, alcalófilos e neutrófilos) e na atmosfera (aeróbios, microaerófilos e anaeróbios).

Existem meios líquidos (usados para o enriquecimento de produtos biológicos), semissólidos (usados em estudos de mobilidade de bactérias e para o crescimento de bactérias anaeróbias) e sólidos (permitem a observação das colónias na sua superfície, são úteis para a obtenção de culturas puras) e podem ser classificados como:

- Não seletivos – sem inibidores de crescimento, com nutrientes que permitem o crescimento de qualquer microrganismo.
- Seletivos – contém antibióticos, antifúngicos ou substâncias químicas que permitem o crescimento de uns microrganismos em detrimento de outros.
- Diferenciais – com substâncias químicas ou corantes que permitem distinguir grupos de microrganismo na mesma amostra.
- Enriquecidos – são meios enriquecidos com nutrientes que permitem a multiplicação dos microrganismos de interesse que se encontrem na amostra.
- De transporte – mantem a viabilidade dos microrganismos sem haver multiplicação dos mesmos.
- De identificação – evidenciam características de determinada espécie, são seletivos e diferenciais.

Na ULS da Guarda apenas são usados meios líquidos e sólidos como podemos observar nas tabelas 3 e 4.

**Tabela 3:** Meios de Cultura Líquidos utilizados no SPC da ULS da Guarda.

<b>Meios de Cultura Líquidos</b>	<b>Composição e Características</b>
<b>Caldo Trypticase Soja</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Composto por uma mistura de peptonas o que permite o crescimento da maioria dos microrganismos não exigentes (bactérias e fungos).</li></ul>
<b>Caldo Coração - cérebro (BHI)</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Composto por uma base nutritiva enriquecida, está especificamente adaptado ao crescimento dos microrganismos aeróbios exigentes;</li></ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incubação: 37°C, durante 24h a 48h, após este período repicar para um meio de cultura sólido adequado.</li> </ul>
<b>Caldo Tetrionato (TT)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• É um meio de enriquecimento utilizado para a pesquisa de microrganismos em amostras de fezes;</li> <li>• Os sais biliares presentes no meio inibem os microrganismos Gram positivo e a adição da solução de iodo (4 gotas) permite a desinfecção do meio garantindo a sua esterilidade;</li> <li>• Após incubação a presença de turvação remete para o crescimento microbiano e processa-se a passagem para um meio seletivo, como o XLD.</li> </ul>
<b>Caldo GN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilizado para o enriquecimento seletivo de organismos gram-negativos, especialmente a <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i>;</li> <li>• A alta concentração de Manitol acima da concentração de Dextrose favorece o crescimento de <i>Salmonella spp.</i> fermentadora de manitol e <i>Shigella spp.</i> e desfavorece espécies que não fermentam manitol, como <i>Proteus spp.</i>;</li> <li>• Incubação: 35°C, durante 6h a 8h, após este período repicar para o meio XLD.</li> </ul>
<b>Caldo Todd Hewitt + Antibióticos (TODD H-T)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• É um caldo de enriquecimento seletivo destinado à detecção dos <i>Streptococcus</i> do grupo B na mulher grávida;</li> <li>• Os antibióticos presentes no meio (ácido nalidíxico e colistina) inibem a maioria dos microrganismos Gram negativos;</li> <li>• Após a etapa de enriquecimento, o caldo Todd-Hewitt + Antibióticos deve ser repicado em meios destinados à detecção dos <i>Streptococcus</i>;</li> <li>• Incubação: 37°C, durante 18h a 24h, após este período repicar para Gelose Granada (GRAN).</li> </ul>
<b>Hemoculturas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meio não seletivo de enriquecimento;</li> <li>• Permite a multiplicação de bactérias fastidiosas e não fastidiosas, bem como de fungos leveduriformes, em amostras de sangue.</li> </ul>

**Tabela 4:** Meios de Cultura Sólidos utilizados no SPC da ULS da Guarda.

Meios de Cultura Sólidos	Composição e Características
<p align="center"><b>Gelose de sangue (GS)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meio não seletivo;</li> <li>• Permite o isolamento de microrganismos fastidiosos e não fastidiosos;</li> <li>• Possui sangue de carneiro que permite a expressão de hemólise (<math>\alpha</math>, <math>\beta</math> ou <math>\gamma</math>), devido à presença do fator X;</li> <li>• Incubação: placas invertidas a 37°C, durante 24h a 48h.</li> </ul>
<p align="center"><b>Gelose de Chocolate (GC)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meio não seletivo;</li> <li>• Permite o isolamento de bactérias fastidiosas, como <i>Neisseria spp.</i>, <i>Haemophilus spp.</i> e <i>Streptococcus pneumoniae</i>;</li> <li>• Composto por uma base nutritiva enriquecida em fatores X (hemina) e V (NAD) provenientes da hemoglobina;</li> <li>• Para crescimento de microrganismos fastidiosos, este meio deve ser incubado numa estufa de atmosfera enriquecida em CO<sub>2</sub>;</li> <li>• Incubação: placas invertidas a 37°C, durante 24h a 48h, na estufa de CO<sub>2</sub>.</li> </ul>
<p align="center"><b>Cystine Lactose Electrolyte Deficient (CLED)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meio diferencial e não seletivo;</li> <li>• Utilizado no isolamento de microrganismos presentes na urina;</li> <li>• Permite a diferenciação entre microrganismos fermentadores da lactose (colónias amarelas), dos microrganismos não fermentadores (colónias azuis, verdes ou incolores);</li> <li>• Limita a invasão (“swarming”) pelo <i>Proteus spp.</i> pela sua deficiência em eletrólitos;</li> <li>• Incubação: placas invertidas, a 37°C durante 24h.</li> </ul>
<p align="center"><b>Gelose MacConkey (MCK)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meio seletivo diferencial;</li> <li>• Permite o isolamento de bacilos de Gram negativo (<i>Enterobacterales</i>, <i>Pseudomonas spp.</i>, entre outros);</li> <li>• Os sais biliares e o cristal violeta inibem o crescimento da maioria das bactérias Gram positivo;</li> <li>• A fermentação da lactose é evidenciada pela viragem do vermelho neutro (microrganismos fermentadores da lactose originam colónias rosas ou vermelhas; microrganismos não fermentadores da lactose originam colónias incolores ou ligeiramente bege);</li> <li>• Incubação: placas invertidas a 37°C, durante 24h a 48h.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meio seletivo diferencial;</li> </ul>

<p align="center"><b>Gelose Manitol Salgado (MSA)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permite o isolamento de <i>Staphylococcus spp.</i> e a identificação presuntiva de <i>S. aureus</i>;</li> <li>• A elevada concentração de cloreto de sódio (NaCl) inibe a maior parte dos Gram negativo permitindo o isolamento de <i>Staphylococcus spp.</i>;</li> <li>• A fermentação do manitol, evidenciada pelo vermelho de fenol, permite a identificação presuntiva de <i>S. aureus</i> (colónias amarelas);</li> <li>• Incubação: placas invertidas a 37°C, durante 24h a 48h.</li> </ul>
<p align="center"><b>Gelose <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina Resistente (MRSA)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meio seletivo diferencial e de identificação (cromogénico);</li> <li>• Permite o isolamento e identificação de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina, na presença de cefoxitina;</li> <li>• Incubação: placas invertidas a 37°C, durante 18h a 24h.</li> </ul>
<p align="center"><b>Gelose Xilose- Lisina- Desoxicolatode Sódio (XLD)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meio seletivo diferencial;</li> <li>• Permite o isolamento de <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i> a partir de fezes;</li> <li>• As bactérias que produzem H<sub>2</sub>S originam colónias com centro negro;</li> <li>• A presença de colónias rosas ou vermelhas com ou sem centro negro (colónias características) representa uma forte presunção de <i>Salmonella</i> ou de <i>Shigella</i>;</li> <li>• Incubação: placas invertidas a 37°C, durante 24h a 48h.</li> </ul>
<p align="center"><b>Yersinia agar (YER)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meio de isolamento seletivo e diferencial;</li> <li>• A presença de manitol e vermelho neutro permite a diferenciação da <i>Yersinia spp.</i> pela coloração das colónias (rosa-escuro e vermelhas);</li> <li>• Incubação: placas invertidas a 25°C, durante 24h a 48h.</li> </ul>
<p align="center"><b>Campyloset (CAM)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meio seletivo para o isolamento de <i>Campylobacter spp.</i> a partir de fezes;</li> <li>• O meio é enriquecido com sangue de carneiro que facilita o crescimento destes microrganismos, e possui antibióticos e antifúngicos que inibem a maior parte dos contaminantes bacterianos e fúngicos;</li> <li>• A incubação deste meio de cultura deve ser feita em atmosfera de microaerofilia;</li> <li>• Incubação: placas invertidas a 37°C, durante 48h a 72h, numa atmosfera de microaerofilia.</li> </ul>
<p align="center"><b>Granada</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meio seletivo, diferencial e de identificação;</li> <li>• Permite o isolamento de <i>Streptococcus</i> do grupo B, utilizado para sementeiras de zangaratoas vaginais e retais;</li> </ul>

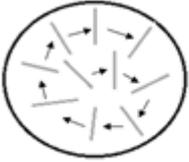
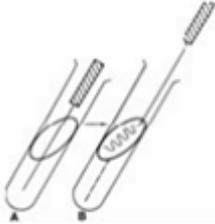
<p align="center"><b>(GRAN)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O crescimento de <i>Streptococcus</i> do grupo B é evidenciado pela presença de colónias cor de laranja;</li> <li>• Incubação: placas invertidas a 37°C, entre 18h a 24h.</li> </ul>
<p align="center"><b>Gelose chocolate VCAT3 (VCA)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meio seletivo para o isolamento de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Neisseria meningitidis</i>;</li> <li>• A seletividade é obtida por associação de antibióticos e antifúngicos que permitem inibir a maioria das outras bactérias e leveduras que não as espécies pesquisadas;</li> <li>• Incubação: placas invertidas a 37°C, durante 24h a 48h, na estufa de CO<sub>2</sub>.</li> </ul>
<p align="center"><b>Gelose D-cocosele (DCO) (Bilis Esculina Agar)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meio seletivo e diferencial;</li> <li>• Permite o isolamento de <i>Enterococcus</i> a partir de amostras polimicrobianas;</li> <li>• A hidrólise da esculina dos <i>Enterococcus</i> provoca o aparecimento de um halo negro à volta das colónias;</li> <li>• A seletividade do meio em relação às bactérias Gram negativas é assegurada pela azida sódica. A bilis inibe algumas bactérias Gram positivas;</li> <li>• Incubação: placas invertidas a 37°C, durante 24h a 48h.</li> </ul>
<p align="center"><b>Gardnerella (GAR)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meio seletivo destinado à deteção de <i>Gardnerella vaginalis</i> a partir de colheitas genitais;</li> <li>• A presença de sangue humano facilita o crescimento da espécie procurada e permite a obtenção de uma β-hemólise à volta das colónias;</li> <li>• Os antibióticos presentes no meio inibem a maioria dos microrganismos Gram negativos bem como das leveduras;</li> <li>• Incubação: placas invertidas a 37°C, durante 48h.</li> </ul>
<p align="center"><b>Sabouraud Cloranfenicol Gentamicina (SGC)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meio de isolamento de fungos e leveduras;</li> <li>• Os fungos e as leveduras são nutridos por glucose e a presença de cloranfenicol e gentamicina inibe o crescimento bacteriano;</li> <li>• Incubação: placas invertidas a 37°C, durante 24h ou a 25°C durante 48h a 72h.</li> </ul>
<p align="center"><b>Candida (CAN)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meio seletivo, diferencial e de identificação;</li> <li>• Permite o isolamento de leveduras e a identificação da espécie <i>Candida albicans</i> e a diferenciação presuntiva de um conjunto de estirpes como a <i>C. tropicalis</i>, <i>C. lusitanae</i> e <i>C. kefyr</i>;</li> <li>• A hidrólise específica de um substrato cromogéneo de hexosaminidase na presença de um indutor da enzima (patente da bioMerieux) leva à coloração azul das colónias de <i>C. albicans</i>;</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A mistura de inibidores permite inibir o crescimento da maior parte das bactérias;</li> <li>• Incubação: placas invertidas a 37°C, durante 24h, 48h ou 72h.</li> </ul>
<p align="center"><b>Mueller Hinton e Mueller Hinton Sangue</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meios não seletivo;</li> <li>• Permitem a realização de antibiogramas de bactérias não fastidiosas por difusão;</li> <li>• O meio com sangue de carneiro, é utilizado para o mesmo fim, mas para bactérias que requerem sangue para o seu crescimento (<i>Streptococcus spp.</i>);</li> <li>• Incubação: placas invertidas a 37°C, durante 24h.</li> </ul>
<p align="center"><b>Meio Lowenstein – Jensen (LT - J)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meio seletivo de enriquecimento;</li> <li>• Permite o isolamento, contagem e diferenciação de micobactérias, principalmente <i>Mycobacterium tuberculosis</i>;</li> <li>• A presença de ovo, aspargina e fécula propicia o crescimento das micobactérias, enquanto o verde de malaquite e os sais minerais inibem o crescimento dos restantes microrganismos;</li> <li>• Incubação: 37°C, numa posição inclinada durante 60 dias (vigiados de 15 em 15 dias).</li> </ul>

A inoculação dos meios de cultura pode ser realizada por vários métodos e requer o uso de ansas (de níquel ou plástico descartáveis). As diversas técnicas de sementeira estão sumariadas na tabela 5.

**Tabela 5:** Técnicas de Sementeira Utilizadas no SPC da ULS da Guarda.

Técnicas de Sementeira	Procedimento
<p align="center"><b>Esgotamento quantitativo</b></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permite a contagem de colónias (UFC's);</li> <li>• O procedimento consiste em fazer um traço longitudinal no meio de cultura com uma ansa de 1µL para o esgotamento do inóculo, posteriormente, partindo do mesmo ponto, fazer estrias paralelas entre si e perpendiculares ao traço inicial, até ao fim da placa.</li> </ul>
<p align="center"><b>Esgotamento qualitativo ou por quadrantes</b></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permite isolar colónias puras;</li> <li>• O procedimento consiste em depositar, com uma ansa, 10µL de inóculo sobre o meio de cultura, junto a periferia e, a partir daí, traçar sobre a superfície do meio uma série de estrias paralelas, de forma leve para não ferir o meio. O inóculo vai-se esgotando de</li> </ul>

	<p>modo que as últimas estrias o inóculo seja mínimo, podendo nessas estrias obter-se colónias isoladas.</p>
<p style="text-align: center;"><b>Rolamento em Placa</b></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Técnica semi - quantitativa, destinada a pesquisa de microrganismos em cateteres centrais, periféricos e arteriais;</li> <li>• O cateter não deve ter um comprimento superior a 5 cm e deve ser colocado sobre o meio de cultura;</li> <li>• A técnica consiste em rodar o cateter sobre toda a área do meio, de forma leve para não ferir o meio, com o auxílio de uma ansa, tendo o cuidado de verificar se todo o cateter está em contacto com o meio.</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>Sementeira em meios sólidos em tubo</b></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Os meios de cultura sólidos em tubo, possuem, na sua grande maioria uma orientação de 45°C, possuindo desta forma um selante (rampa de sementeira);</li> <li>• A inoculação pode ser feita à superfície, em profundidade ou ambos;</li> <li>• A inoculação em superfície consiste em fazer estrias na rampa de sementeira, utilizando uma ansa de 1 µL sem perfurar o meio (B);</li> <li>• A inoculação em profundidade consiste em perfurar o meio de cultura, com uma ansa de 1 µL, retirando-a do mesmo modo (A).</li> </ul>

Após a inoculação dos meios estes seguem para estufas próprias, respeitando as condições ótimas de crescimento de cada microrganismo.

#### **6.4 Testes de orientação / de identificação presuntiva**

Após observação de crescimento nos meios de cultura selecionados, são executados alguns testes que orientam na identificação presuntiva dos microrganismos. Estes testes encontram-se enumerados na Tabela 6.

**Tabela 6:** Teste de Orientação para Identificação de Microrganismos Utilizados no SPC da ULS da Guarda.

Teste	Objetivo	Procedimento e Comentário
<b>Teste da Catalase</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permite a distinção entre estafilococos (catalase positivo) de estreptococos (catalase negativo);</li> <li>• Também permite distinguir bacilos Gram + não formadores de esporos, listérias e corinebactérias (catalase positivo) de lactobacilos e actinomices (catalase negativo).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O teste consiste em colocar, numa lâmina, um pedaço de uma colónia com uma gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% (v/v) – se aparecerem bolhas o microrganismo é catalase-positivo. As bolhas são formadas pelo oxigénio molecular libertado na reação da catalase;</li> <li>• Deve ter-se especial cuidado quando o teste se faz a partir de colónias que cresceram em meios contendo sangue, porque o sangue contém catalase, e um arrastamento do meio com a colónia pode levar a um resultado falso positivo.</li> </ul>
<b>Teste da Coagulase</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permite a distinção entre os <i>Staphylococcus aureus</i> (coagulase positivo) dos outros membros da família <i>Micrococcaceae</i>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Este teste é realizado com o auxílio de um Kit comercial (reagente constituído por partículas de latex sensibilizadas com fibrinogénio humano e anticorpos anti proteína A do <i>S. Aureus</i>);</li> <li>• Coloca-se, em partículas de latex, uma gota do reagente juntamente com uma colónia, após 20 segundos, observamos se há aglutinação é coagulase positiva.</li> </ul>
<b>Teste da Oxidase</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permite a distinção entre a família <i>Enterobacteriaceae</i> (oxidase negativa) de outros géneros como <i>Aeromonas</i>, <i>Pseudomonas</i>, <i>Neisseria</i>, <i>Campylobacter</i> e <i>Pasteurella</i> (oxidase positiva).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Utiliza-se um Kit comercial, indica a presença da enzima oxidase no citocromo C das bactérias;</li> <li>• Num papel absorvente coloca-se uma colónia em contacto com uma gota do reagente se</li> </ul>

		apresenta uma cor purpura é oxidase positiva.
<b>Teste da Urease</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permite a distinção entre <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i> (urease negativa) de <i>Proteus spp.</i> (urease positiva).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A urease é uma enzima que hidrolisa a ureia com libertação de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e NH<sub>3</sub>. A amónia resulta da alcalização do meio pois forma carbonato de amónio;</li> <li>• Num tubo adicionamos o reagente que contém fenolftaleína a pH &lt; 8,1 (incolor) com a adição da colónia se tiver amónia o pH aumenta e fica rosa avermelhada significa que o teste da urease é positivo.</li> </ul>
<b>Teste de Lancefield</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diferenciar por grupos os <i>Streptococcus spp.</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Teste de aglutinação que se baseia na composição de um polissacarídeo (carboidrato C) que se encontra na parede da célula dos estreptococos;</li> <li>• Em cada círculo do cartão de aglutinação do kit coloca-se uma gota de cada reagente (suspensão sensibilizada com imunoglobulinas específicas para cada grupo de estreptococos) juntamente com uma gota de uma suspensão realizada a partir das colónias. Após agitação observamos a aglutinação;</li> <li>• Grupos do A ao G, alguns exemplos: Grupo A - <i>S. pyogenes</i> Grupo B - <i>S. agalactae</i> Grupo D - <i>S. bovis</i> e <i>S. equinus</i> Grupo F - <i>S. anginosus</i></li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permite testar a sensibilidade do <i>Streptococcus pneumoniae</i> à optoquina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permite testar a sensibilidade do <i>Streptococcus</i> à optoquina. O teste é utilizado para efetuar a identificação presuntiva das</li> </ul>

<p><b>Teste da Optoquina</b></p>		<p>colónias de <i>S. pneumoniae</i> isoladas em cultura pura e diferenciá-los dos <i>S. viridans</i> (<math>\alpha</math>-hemolíticos);</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Um halo de inibição igual ou superior a 15 mm significa uma presença eventual de <i>S. pneumoniae</i>.</li> </ul>
<p><b>Testes Serológicos para classificar em Grupos de Salmonellas</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Serotipar <i>Salmonella pp.</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• De acordo com a espécie de <i>Salmonella spp.</i> Podem ser classificadas em diferentes grupos por diferentes tipos de antígeno: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Antígenos somáticos (O) - são compostos por polissacarídeos, designados por números e classificados como antígenos Major ou Minor;</li> <li>- Antígenos flagelares (H) - são de natureza proteica, sendo que a cadeia de aminoácidos é determinada pelos genes H1 e H2 e conferem a presença e mobilidade dos flagelos;</li> <li>- Antígeno de superfície (Vi) - só está presente em três serotipos: <i>S. typhi</i>, <i>S. paratyphi C</i> e <i>S. dublim</i>. Este antígeno permite mascarar a presença do antígeno O, tornando-o inaglutinável.</li> </ul> </li> <li>• Esta prova baseia-se numa reação de aglutinação pelo que são utilizados reagentes compostos por anticorpos específicos para cada um dos antígenos. A reação de aglutinação significa um resultado positivo para esse grupo.</li> </ul>

<b>Teste de MRSA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detecção de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à Meticilina.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quando os resultados do teste da catalase e da coagulase são positivos, efetua-se este teste para verificar a resistência ou não. Se for positivo deve-se informar o clínico de imediato.</li> </ul>
----------------------	---	---

### 6.5 Identificação bacteriana

Após a realização de testes de identificação rápida, no SPC a maioria dos microrganismos são identificados através do sistema automatizado VITEK®2 compact da Biomerieux®, este sistema usa cartas de identificação, como podemos observar na figura 22, cujo conteúdo são diferentes substratos bioquímicos que permitem a identificação dos diferentes microrganismos e cartas de antibiograma, que são baseadas em métodos de diluição. A tabela 7 mostra as cartas de identificação e os testes de sensibilidade usados no SPC.

**Tabela 7:** Cartas de identificação e Testes de sensibilidade microbiana usados no SPC da ULS da Guarda.

<b>Carta de identificação (ID)</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Teste de sensibilidade antimicrobiana (AST)</b>
<b>GN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gram Negativos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• N355 (Gram negativos aeróbios – maioria das bactérias isoladas em urina)</li> <li>• N373 (Gram negativos aeróbios não fermentados – principalmente <i>Pseudomonas spp.</i> e <i>Acinetobacter spp.</i>)</li> </ul>
<b>GP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gram Positivos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• P648 (Direcionado para <i>Staphylococcus spp.</i>)</li> <li>• P586 (Direcionado para <i>Enterococcus spp.</i>)</li> <li>• STO3 (Direcionado para <i>Streptococcus spp.</i>)</li> </ul>
<b>ANC</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bacilos Gram positivos</li> </ul>	
<b>NH</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Campylobacter spp.</i>, <i>Neisseria spp.</i> e <i>Haemophilus spp.</i></li> </ul>	
<b>YST</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Leveduras</li> </ul>	

Para a identificação são usadas colónias isoladas que são transferidas para uma solução salina estéril, de modo a obter uma suspensão de acordo com a escala de MacFarland, dependendo do microrganismo a identificar. A suspensão e as cartas de identificação são inseridas no VITEK® e este procede à sua incubação. De 15 em 15 minutos é feita a monitorização automática da alteração da cor/turvação em cada um dos poços da carta que, previamente, tinham sido cheios com a suspensão. Ao fim de algumas horas é obtida a identificação dos microrganismos.

A determinação da sensibilidade aos antibióticos baseia-se no cálculo da concentração mínima inibitória (CMI) dos diferentes antibióticos presentes nas cartas. A partir da suspensão bacteriana previamente preparada para a identificação, é preparada uma nova suspensão, de concentração variável, dependendo do microrganismo em estudo, que vai ser processada de forma semelhante à identificação, mas, desta vez com concentrações de antibióticos liofilizados, de 15 em 15 minutos há uma leitura da turvação que será proporcional ao crescimento bacteriano. São construídas curvas que permitem o cálculo das CMI para os diferentes antibióticos. Os resultados dados pelo equipamento são reportados como, sensível, intermédio ou resistente.

Os resultados do equipamento são analisados e os antibióticos que melhor se adequam ao microrganismo em causa são reportados ao clínico de acordo com as normas da EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*).



**Figura 27:** Carta de identificação do equipamento VITEK® 2.

Quando o sistema automatizado não consegue obter resultado na suscetibilidade microbiana ou quando o antibiótico que se pretende estudar não se encontra nas cartas podemos recorrer a E - tests, que são testes de suscetibilidade microbiana onde se recorre a tiras impregnadas em antibióticos que permitem determinar a CMI em placa, em meio de Muller-Hinton (para a maioria dos microrganismos, Gelose de Sangue para *Streptococcus spp.* e Gelose de Chocolate para estirpes de crescimento fastidioso), exemplos: *Neisseria spp.* e *Haemophilus spp.*

Os E-tests também são utilizados para confirmar alguns mecanismos de resistência, por exemplo, produção de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado,  $\beta$ -lactamases AmpC, metalo  $-\beta$ -lactamases e carbapenemases.

## 6.6 Produtos biológicos

Todos os produtos biológicos, quando chegam ao laboratório são processados segundo procedimentos devidamente escritos, atendendo à especificidade de cada produto biológico e ao microrganismo mais provavelmente responsável da infeção.

### 6.6.1 Líquido Cefalorraquidiano (LCR)

O LCR é um líquido incolor e estéril que se encontra no nosso Sistema Nervoso Central (SNC) e tem como função a sua proteção mecânica.

A meningite bacteriana é uma doença grave que esta associada a alta morbilidade e mortalidade se o agente etiológico não for diagnosticado prontamente.

As amostras de LCR devem ser processadas imediatamente após a colheita, uma vez que alguns agentes patológicos comuns são pouco resistentes às condições ambientais como por exemplo a *Neisseria meningitidis* e o *Streptococcus pneumoniae* (Manual de Colheitas Da ULS Guarda, 2021). Ao chegar ao laboratório a amostra é centrifugada para concentrar e o sedimento é usado para fazer o esfregaço (corado pelo método de Gram) e para ser semeado nos meios de cultura GS e GC.

O laboratório deve comunicar de imediato ao clínico se forem observados microrganismos na coloração de Gram ou crescimento nos meios de cultura.

Para um diagnóstico mais rápido são realizados outros exames em simultâneo

- Observação macroscópica do líquido para verificação de cor e turvação;
- Contagem de células;
- Exame bioquímico do líquido para pesquisa de proteínas e glucose;
- Pesquisa de antígenos capsulares (teste rápido de aglutinação que pesquisa a presença dos antígenos da cápsula das principais bactérias responsáveis por meningite: *E. coli* K1, *Streptococcus B*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* A, C, Y/W135 e B/E e *H. influenza* e tipo b)
- Pesquisa por Biologia Molecular de um painel vasto de microrganismos (*H. influenza*, *Listeria monocytogenes*, *N. meningitidis*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*, *E. coli* K, *Cytomegalovirus*, *Enterovirus*, *Herpes simplex vírus 1* e *2*, *Human herpes vírus 6*, *Human parechovirus*, *Vírus varicela zoster* e do *Cryptococcus neoformans/gattii*).

Por vezes, se houver quantidade suficiente de LCR é feita cultura num meio líquido de enriquecimento, nomeadamente, numa garrafa pediátrica de hemocultura.

### **6.6.2 Outros Líquidos**

Há uma grande variedade de outros líquidos orgânicos estéreis (líquido pleural, peritoneal, sinovial e pericardial) que podem ser colhidos para cultura bacteriológica.

Tendo em conta que em princípio estes líquidos são estéreis, qualquer microrganismo que cresça no meio deve ser pesquisado (Manual de Colheitas Da ULS Guarda, 2021).

Quando a amostra chega ao laboratório é realizado um esfregaço para coloração de Gram e outro para coloração de Leishman para observar a presença de leucócitos e células epiteliais. São semeados dois meios, GS e GC.

Além disto, estes líquidos estão sujeitos a contagem por citometria de fluxo, contagem de proteínas totais, glucose, pH e densidade.

### **6.6.3 Hemoculturas**

O exame microbiológico do sangue é realizado para pesquisa de microrganismos a partir de meios de cultura líquidos específicos. Tendo em conta que é um produto biológico estéril o isolamento de um microrganismo de uma hemocultura é, geralmente, o agente etiológico da infeção.

A colheita pode ser feita em dois locais: através de uma colheita central ou por punção de veias periféricas (colheita periférica).

A colheita é feita para meios de cultura líquidos que chamamos de garrafas de hemocultura, há 4 tipos: aeróbia (azul) para crescimento de microrganismo aeróbios, anaeróbia (roxa) para crescimento de microrganismos anaeróbios, pediátrica (rosa) e para pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis* (vermelha) (Manual de Colheitas Da ULS Guarda, 2021). As garrafas são colocadas num aparelho para incubação de hemoculturas, o BACTEC™ FX, durante pelo menos 5 dias ou até deteção de uma amostra positiva. O aparelho deteta o crescimento bacteriano através da produção de CO<sub>2</sub>, quanto maior for o crescimento de microrganismos maior será a produção de CO<sub>2</sub>. Quando o equipamento dá indicação de uma garrafa de hemocultura positiva esta é retirada do equipamento e após a preparação de uma lâmina para coloração pelo método de Gram são inoculados os seguintes meios: GS e GC.

### **6.6.4 Cateter**

Os cateteres são uma porta de entrada para o aparecimento de infeções, sendo que, quanto mais tempo estiverem presentes maior predisposição a estas.

Para fazer a pesquisa de microrganismos num cateter este deve chegar ao laboratório acompanhado de uma hemocultura para descartar se a infeção está só no cateter ou já se encontra na corrente sanguínea (Manual de Colheitas Da ULS Guarda, 2021).

Deve ser semeado por dois métodos, primeiro pela técnica de Maki, semi quantitativa, em rolamento e segundo semeado quantitativamente após sonicação para a libertação das bactérias do biofilme que se forma no lúmen do cateter. A sementeira é feita em GS e GC (capnofilia até as 48h a 37°C).

#### **6.6.5 Feridas, Pus e Tecidos**

As feridas abertas são frequentemente colonizadas por microrganismos potencialmente patógenos que podem ou não estar relacionados com o processo infeccioso que procuramos. Portanto, é importante a ferida ser bem limpa e a colheita realizada na profundidade da lesão.

Da mesma forma, o aspirado de um abscesso fechado deve também ser colhido tanto do centro como das paredes, uma vez que a maioria dos microrganismos cresce na base do abscesso e não no centro (Manual de Colheitas Da ULS Guarda, 2021).

Os tecidos também devem ser obtidos com uma porção representativa, quando chegam ao laboratório são sujeitos a sonicação para a libertação do biofilme.

São realizadas duas lâminas, uma com coloração de Gram e outra de Leishman e são semeados os seguintes meios GS, GC, SCG, DCO, MSA, MRSA e MCK.

#### **6.6.6 BÍlis**

Uma infeção da vesícula biliar pode ter várias causas, uma delas é a infeção por microrganismos presentes no intestino, que, devido a uma perfuração deste estão a deslocar-se para a vesícula biliar, para fazer esta verificação é enviada a amostra de BÍlis para o laboratório (Manual de Colheitas Da ULS Guarda, 2021).

São feitas duas lâminas, uma coloração de Gram e outra de Leishman, e são semeados os seguintes meios: GS, MCK, YER, CAMP, MSA, MRSA, DCO e XLD e caldo GN que após 6 a 8 horas é semeado em XLD.

#### **6.6.7 Urina**

O processamento de amostras de urina tem como objetivo diagnosticar uma possível infeção do trato urinário (ITU). A colheita pode ser realizada por diferentes métodos: micção “jato médio”, punção de cateter urinário/algália, punção supra - púbica, drenagem de

nefrostomia/ureterotomia ou pelo saco coletor em crianças. Uma vez que, a uretra possui uma microflora residente que pode ou não ser patogénica, a primeira porção da urina coletada por micção espontânea ou cateterização deve ser descartada.

Há possibilidade de infeção por duas vias principais: ascendente e descendente.

A via ascendente é a mais frequente e é favorecida por introdução de corpos estranhos ao organismo, como por exemplo um cateter urinário, a introdução do cateter pode levar a introdução de bactérias diretamente na bexiga ou à movimentação através deste objeto desde a uretra até à bexiga.

A via descendente pode ser resultado de uma bacteriemia, mas esta via é responsável por menos de 5% das ITU (Manual de Colheitas Da ULS Guarda, 2021).

Quando chega ao laboratório é feita a observação do sedimento, de modo a avaliar a existência de resposta inflamatória, como a presença de leucócitos, eritrócitos, e ainda procurar a presença de bactérias, leveduras e células epiteliais escamosas. De seguida é feita a coloração de Gram da amostra e semeada em meio de CLED.

Após o tempo de incubação, na interpretação de resultados são valorizadas todas as culturas com número de unidades formadoras de colónia  $\geq 10^5$ /mL e todas as culturas com número de colónias entre  $10^4$  a  $10^5$  UFC/mL de uma ou duas espécies bacterianas.

Se a urocultura não estiver pura procedemos à repicagem das colónias ou sementeira para diferentes meios, como MSA, DCO e MCK.

Após a obtenção de culturas puras ou se no CLED já estiver pura, procede-se à realização de testes presuntivos de identificação e à preparação da suspensão para identificação e determinação de teste de suscetibilidade aos antimicrobianos no VITEK®.

Não são valorizadas culturas com crescimento de 3 espécies de microrganismos ou mais, reporta-se como cultura polimicrobiana e recomenda-se repetição de colheita asséptica.

Também são realizados testes rápidos e quantitativos a partir das amostras de urina para a pesquisa de antígenos de *Legionella pneumophila* e *Streptococcus pneumoniae*. São ensaios de imunofluorescência (ligação Ag - Ac) que visam a deteção rápida de antígenos solúveis na urina.

#### **6.6.8 Exsudados vaginais e uretrais**

A vagina e a uretra são os únicos locais do trato urogenital que têm uma flora comensal permanente. A flora vaginal é muito rica e sofre alterações relacionadas com a idade, fatores hormonais já a uretra é relativamente pouco colonizada.

Nos exsudados vaginais por norma pesquisa-se: *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus agalactiae* - grupo B

(mulheres grávidas entre a 35<sup>a</sup> e 37<sup>a</sup> semanas para despiste da colonização) e *Candida albicans*. Nos exsudados uretrais pesquisa-se a presença de *N. gonorrhoeae*.

A colheita deve ser feita por meio de três zaragatoas diferentes, de modo a conservar a maioria dos microrganismos (1 em meio de Stuart, 1 em meio de transporte de carvão e 1 seca) (Manual de Colheitas Da ULS Guarda, 2021).

Quando amostra chega ao laboratório é feito um Gram (da zaragatoa em meio de Stuart) onde se descreve a flora existente. São avaliadas as células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, leveduras e a presença de *Trichomonas vaginalis*.

A zaragatoa em meio de carvão é usada para semear os meios: GS, GC, GC VCAT (próprio para pesquisa de *Neisseria gonorrhoeae*), GAR (próprio para pesquisa de *Gardnerella vaginalis*) e CAN (pesquisa de *Candida albicans*), também se utiliza um meio líquido Todd Hewitt e após 24h é semeado em GRAN.

A zaragatoa seca é utilizada para um teste rápido imunocromatográfico para pesquisa de *Trichomonas vaginalis*.

#### **6.6.8.1 Pesquisa de *Streptococcus agalactiae* em grávidas**

O *Streptococcus* do grupo B é uma bactéria que pode colonizar o trato geniturinário ou gastrointestinal da grávida podendo levar a uma infecção do recém-nascido durante o parto e provocar pneumonia, sépsis e até mesmo meningite no recém-nascido, portanto, idealmente, todas as grávidas, entre a 35<sup>o</sup> e 37<sup>o</sup> semanas de gravidez devem fazer esta pesquisa. A colheita é feita através de zaragatoa seca vaginal e retal (Manual de Colheitas Da ULS Guarda, 2021).

Quando as zaragatoas chegam ao laboratório são inseridas no meio líquido de enriquecimento das diferentes espécies de *Streptococcus spp* – Meio de Todd Hewitt, após 18h a 24h é feita a passagem para o meio de Granada específico para isolamento deste microrganismo, a presença de colónias alaranjadas pode significar presença de *S. agalactiae*.

#### **6.6.9 Fezes**

As fezes são um produto biológico que têm uma microbiota comensal mista muito abundante. O processamento de amostras de fezes tem como objetivo auxiliar no diagnóstico de doenças ou infecções do intestino através da pesquisa de bactérias, vírus, parasitas, sangue, entre outros. Uma amostra de fezes adequada é a que é diarreica ou apresenta fezes moldadas (Manual de Colheitas Da ULS Guarda, 2021).

Quando chegam ao laboratório, uma amostra do tamanho de uma “amêndoa” é diluída em 10 mL de soro fisiológico e a partir daqui é feita a coprocultura.

São feitas duas lâminas, uma coloração de Gram e outra coloração de Leishman, apesar de ser muito difícil a visualização ao microscópio devido aos artefactos presentes nas amostras. São semeadas em XLD, YER, CAM, MSA, MRSA e Caldo GN que após 6 a 8 horas semeia-se em XLD.

Ao fim do período de incubação, observam-se as placas para pesquisa de colónias características. As colónias suspeitas devem ser identificadas:

- Colónias suspeitas no meio de *Yersinia* (YER) – as colónias cor-de-rosa escuras ou vermelho são consideradas suspeitas;

- Colónias suspeitas nos meios para pesquisa de *Salmonella* e *Shigella* (XLD) – as colónias não fermentadoras de lactose (*Shigella*) são consideradas colónias suspeitas, uma vez que os principais agentes causadores de gastroenterite são não fermentadores da lactose. As colónias de *Salmonella spp.* têm a capacidade de produzir H<sub>2</sub>S, apresentando uma cor negra no meio, no entanto, há outras bactérias que fazem parte da flora comensal, como o *Proteus spp.* que também apresentam uma cor negra no meio, portanto para descartar fazemos a o teste da urease e/ou identificação no VITEK®. Se o VITEK® confirmar a identificação de *Salmonella spp.* ou *Shigella spp.*, efetua-se a serogrupagem para os principais grupos, caso não se consiga obter resultado conclusivo enviamos a estripe para um laboratório de referência (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge).

- Colónias suspeitas de *Campylobacter spp.* são confirmadas através de exame microscópico após coloração de Gram.

- Colónias suspeitas no meio, MSA – são colónias fermentadoras de manitol suspeitas e ser colónias de *Staphylococcus aureus*.

- Colónia em meio de MRSA – colónia de cor púrpura suspeita de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina.

No SPC há vários testes rápidos para deteção de microrganismos nas fezes:

- Teste de deteção rápida e qualitativa de antígenos rotavírus, adenovírus, *Campylobacter*, *Escherichia coli* (EHEC) e *Helicobacter pylori* é usado um imunoensaio de quimioluminiscência. Para a realização deste ensaio é realizada uma preparação prévia da amostra que sofre um processo de extração.

- Pesquisa de *Clostridium difficile* consiste num imunoensaio enzimático qualitativo para a deteção de antígeno. Se der positivo é feita a pesquisa da estirpe toxigénica por Biologia Molecular.

- Pesquisa de sangue oculto nas fezes é um exame muito importante para a deteção precoce de várias patologias gastrointestinais, sendo o cancro do cólon a mais relevante. Para

este teste utiliza-se também um ensaio imunocromatográfico para a pesquisa de hemoglobinas nas fezes. São necessárias 3 amostras diferentes colhidas em dias diferentes.

- Pesquisa de parasitas – pesquisa feita após método de concentração por sedimentação, sendo este sedimento observado em microscópio a fresco, em três amostras diferente colhidas em dias diferentes. Adicionalmente são realizados dois testes imunocromatográficos para pesquisa de *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum*

#### 6.6.10 Amostras do Trato Respiratório

- Trato Respiratório Superior

A avaliação microbiológica de amostras respiratórias do trato respiratório superior, como expetorações, secreções brônquicas e aspirados traqueais é feita com o intuito de auxiliar no diagnóstico de uma possível infecção respiratória neste local. Durante a colheita destas amostras existe contaminação pela flora comensal da boca e da orofaringe o que por vezes inviabiliza a amostra. Vários agentes patogênicos como o *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *H. influenzae*, *N. meningitidis*, leveduras e membros das *Enterobacteriales*, podem constituir uma flora transitória ou estar presente em pequeno número na orofaringe de indivíduos saudáveis.

Portanto, devido a esta contaminação é feito um “screening” antes de processar as amostras, este é feito com base nas recomendações do *Cumulative Techniques and Procedures Clinical Microbiology* (CUMITECH) e a Tabela de Murray e Washington (tabela 8), as amostras biológicas com células epiteliais  $\geq 25$  por campo, são geralmente inaceitáveis para exame bacteriológico por excessiva contaminação orofaríngea, por isso, para estas amostras suscetíveis de contaminação é feito, primeiramente um exame citológico, pela observação microscópica da amostra pela coloração de Leishman. As amostras com células epiteliais  $\geq 25$  por campo são descartadas e é pedida a realização de nova colheita.

**Tabela 8:** Tabela de Murray e Washington.

Grupos	Células epiteliais / pequena ampliação (10x)	Leucócitos / pequena ampliação (10x)
Grupo 1	25	10
Grupo 2	25	10 – 25
Grupo 3	25	25
Grupo 4	10 – 25	25
Grupo 5	<10	25

Após a observação da lâmina as amostras do grupo 4 e 5 da tabela de Murray e Washington são semeadas em GS, GC e é feito um esfregaço com coloração de Gram.

- Trato Respiratório Inferior

As amostras do trato respiratório inferior (aspirados traqueobrônquicos, aspirados brônquicos e lavados bronco-alveolares) são obtidos através de uma aspiração diretamente para o tubo da amostra, apesar de ser uma técnica mais invasiva, torna-a mais representativa, uma vez que não existe contaminação orofaríngea (Manual de Colheitas Da ULS Guarda, 2021).

Como não há contaminação, não é necessário realizar o exame direto pela coloração de Leishman.

A amostra chega ao laboratório e são feitas duas lâminas, uma coloração de Gram e outra Leishman e são diretamente semeadas em GS, GC e SGC.

### **6.7 Pesquisa de Micobactérias**

A família das *Mycobacteriaceae* compreende apenas o género *Mycobacterium*. São bactérias aeróbias, imóveis, não capsuladas e não formadoras de esporos. Habitualmente, apresentam uma morfologia bacilar ou cocobacilar. Caracteristicamente os bacilos são finos, retos ou ligeiramente encurvados, aparecem isolados, aos pares ou em pequenos agrupamentos de bacilos paralelos (Tille, 2022).

As bactérias do género *Mycobacterium* têm uma parede celular que é extremamente rica em lípidos, que incluem ceras, têm ácidos micólicos com cadeias longas e ramificadas, o que torna a superfície hidrofóbica e concede a estas bactérias propriedades importantes em termos taxonómicos e na patogenia das respetivas infeções. Por esta razão, estas bactérias são resistentes à coloração por variados corantes utilizados comumente em bacteriologia, como por exemplo, o método de Gram. Por outro lado, uma vez coradas, resistem à descoloração por soluções ácido - alcoólicas, sendo-lhes por isso atribuída a designação de bacilos álcool - ácido resistentes (BAAR). Isto significa, que a coloração com um primeiro corante, vai-se manter após descoloração com solução álcool - ácida, não adquirindo as bactérias a coloração com um segundo corante administrado. Embora não seja só específico das micobactérias, a ácido - resistência é talvez a sua característica mais importante em termos de identificação laboratorial. A metodologia de coloração ácido - resistente mais utilizada é a coloração de Ziehl - Neelsen (Sousa et al., 2012).

Nas amostras em que é pedido a pesquisa de micobactérias é preparado um esfregaço a partir do produto, para ser corado pela técnica de auramina ou pela técnica de Ziehl - Neelsen.

Quando são observados num esfregaço BAAR, como na figura 23, os resultados devem ser quantificados, pela técnica de Ziehl - Neelsen o que vai permitir saber qual a quantidade

de bacilos excretados e a extensão da infecção que é importante em termos clínicos e epidemiológicos.

A maioria das amostras processadas para a pesquisa de micobactérias contém outros microrganismos contaminantes, pelo que, o laboratório procede à sua descontaminação (com hidróxido de sódio-citrato trissódico) e concentração, uma vez que, permite aumentar a eficiência na recuperação das micobactérias já existentes na amostra, eliminando todos os outros microrganismos. Amostras como a expetoração são fluidificadas com N – acetil – L - cisteína para um melhor isolamento e sedimentação.

As amostras depois de descontaminadas e tratadas são inoculadas em meio de Löwenstein - Jensen e BD BBL MGIT que é um tubo indicador de crescimento bacteriano.

Os tubos de Löwenstein-Jensen são incubados até 60 dias na estufa a 37°C e são observados todas as semanas. Sempre que é observado crescimento suspeito em algum deles efetua-se uma lâmina corada com coloração de Ziehl - Neelsen para avaliar e pesquisar BAAR. Se algum dos tubos inoculados tiver crescimento e se se considerar ser quantidade suficiente procede-se à identificação da micobactéria e respetivo antibiograma. Se os tubos não apresentarem crescimento após os 60 dias o resultado será dado como negativo.

Os tubos de BD BBL MGIT contém um caldo de Middlebrook OADC (com albumina bovina) que está suplementado com uma mistura de antibióticos, para suprimir o crescimento da flora normal das amostras e aumentar a recuperação das micobactérias. O desenvolvimento das micobactérias é muito lento e, portanto, exige períodos de incubação prolongados, cerca de 42 dias.

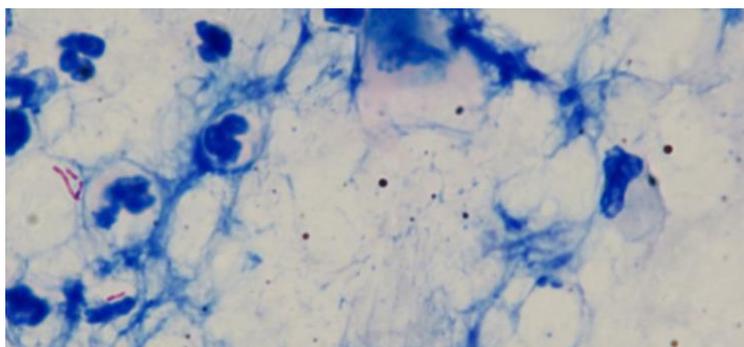
A amostra é incubada a 37°C no sistema BACTEC MGIT 960. A respiração dos microrganismos aeróbios presentes no meio origina uma diminuição de oxigénio que provoca um aumento da fluorescência do sensor do meio. Um aumento da fluorescência dá origem a uma leitura positiva que indica a presença presuntiva de micobactérias no meio. Nestes casos, é retirado o frasco do equipamento e é efetuado um esfregaço para coloração de Ziehl - Neelsen, outro para a coloração de Gram e é feita uma sementeira em GS, para verificar se a amostra é positiva para BAAR ou é uma contaminação.

Após visualização de BAAR é feita identificação e antibiograma.

Nas amostras em que se observe a presença de outros microrganismos (bactérias/leveduras) são submetidas a um novo processo de descontaminação e incubação.

Quando a amostra chega ao SPC, é separada parte da amostra para o Laboratório de Biologia Molecular e é realizada, diretamente da amostra, a pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis* por PCR que deteta o DNA presente das micobactérias, bem como testes de

resistência aos antimicrobianos, rifampicina e isoniazida (Manual de Colheitas Da ULS Guarda, 2021).



**Figura 28:** Esfregaço de uma amostra positiva para BAAR.

### **6.8 Teste Respiratório para o Diagnóstico e Monitorização Durante e Pós Tratamento na Infecção por *Helicobacter Pylori***

No laboratório de microbiologia do SPC é também realizado um teste rápido respiratório para a deteção de *H. pylori*.

A infecção por *Helicobacter pylori* é uma infecção bacteriana que causa inflamação no estomago (gastrite), úlcera péptica e determinados tipos de tumor de estomago.

O teste respiratório é um teste simples, como podemos observar na Figura 24, em que é utilizada uma cápsula que contém ureia ( $^{14}\text{C}$ ), ligeiramente radioativa. Para evitar o risco de diagnóstico errado deve-se pelo menos 4 semanas antes do teste suspender a toma de antibióticos ou sais de bismuto, pelo menos 1 semana antes do teste suspender a toma de inibidores da bomba de prótons e fazer jejum pelo menos 6 horas. O utente deve engolir a cápsula com aproximadamente 50 ml de água e aguardar 10 minutos. De seguida deve expirar o BreathCard<sup>®</sup> cedido. O sopro deverá continuar até o indicador altere a cor de laranja para amarelo em 2-4 minutos. A deteção é efetuada colocando o referido cartão no equipamento Heliprobe<sup>®</sup>System (Manual de Colheitas Da ULS Guarda, 2021).



**Figura 29:** Instruções do Teste para a Deteção de *Helicobacter pylori*.

## **7 Controlo de Qualidade**

O controlo de qualidade é o processo que pretende minimizar os erros no laboratório, de modo a garantir a segurança, a confiança e a precisão dos resultados obtidos, de forma que seja possível fornecer ao cliente os melhores cuidados possíveis. É essencial que este esteja sempre presente, em todas as tarefas que são realizadas no laboratório, como, procedimentos, critério de rejeição, tempo de resposta, valores críticos, controlos e calibração.

Neste âmbito, no SPC, existem dois programas, controlo de qualidade interno e externo.

### **7.1 Controlo de Qualidade Interno (CQI)**

O controlo de qualidade interno no SPC deve ser realizado antes do início de cada sessão de trabalho e cada vez que se proceda à alteração das condições de trabalho, como mudança de lote de reagentes ou determinadas manutenções dos equipamentos.

Para proceder a este controlo utilizam-se sobretudo estirpes ATCC (na microbiologia), controlos independentes e controlos fornecidos pelas próprias casas comerciais fornecedoras dos reagentes (na imunologia) que permitem avaliar a precisão de todos os procedimentos, ou seja, o desempenho diário dos equipamentos, reagentes e consumíveis e avaliar o desempenho do operador a nível técnico.

### **7.2 Controlo de Qualidade Externo (CQE)**

O controlo de qualidade externo é feito por uma entidade externa ao laboratório, a qual envia amostras cegas a vários e diferentes laboratórios, permitindo, deste modo, a avaliação do desempenho de um laboratório em comparação com outros laboratórios. Existem vários programas de avaliação externa disponíveis. No SPC da ULS da Guarda são utilizados o UK NEQAS, o LabQuality e o INSTAND. As amostras recebidas são processadas nas mesmas condições das amostras dos utentes, e os resultados são enviados posteriormente para a entidade referida. A entidade externa, após realizar o tratamento dos dados provenientes de todos os laboratórios participantes, emite um relatório onde consta a apreciação dos resultados obtidos pelo nosso laboratório. Dependendo dos resultados, caso se verifique uma discrepância significativa dos nossos resultados em relação à média dos resultados obtidos pelos outros laboratórios, é necessário a implementação de ações corretivas e/ou preventivas de modo a melhorar o desempenho do nosso laboratório. Este sistema de avaliação permite garantir a qualidade dos resultados obtidos pelo nosso

laboratório, promovendo a confiança dos utentes, do corpo clínico e dos profissionais de saúde que trabalham no SPC.

## **8 Conclusão**

Este estágio curricular representa o final de mais uma etapa académica, no qual me foi possível aplicar os conhecimentos teóricos, adquiridos no decorrer do Mestrado em Análises Clínicas, na prática laboratorial, permitindo aprofundar a maioria deles.

A realização deste estágio e a passagem pelos diferentes setores do SPC da ULS da Guarda permitiu-me ter uma noção de toda a rotina laboratorial envolvida e da importância de um processamento adequado das amostras, da sua distribuição e do controlo de qualidade. Importa referir que esta divisão por setores é meramente física, uma vez que no final, os resultados obtidos nos diferentes setores são analisados conjuntamente, numa avaliação biopatológica.

## 9 Bibliografia

Andres, E., & Serraj. (2012). **Optimal management of pernicious anemia**. *Journal of Blood Medicine*, 97. [Acedido a 25 de março de 2022]. Disponível na internet: <https://doi.org/10.2147/JBM.S25620>.

Bogdanos, D. P. [et al.] (2008). **Autoimmune liver serology: Current diagnostic and clinical challenges**. *World Journal of Gastroenterology*, 14(21), 3374. [Acedido a 13 de março de 2022]. Disponível na internet: <https://doi.org/10.3748/wjg.14.3374>.

Buitrago, J. (2000). **Enfermedades Autoiunitárias Y Autoanticuerpos** (Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Ed.).

Chan, E. K. L. [et al.] (2015). **Report of the First International Consensus on Standardized Nomenclature of Antinuclear Antibody HEp-2 Cell Patterns 2014–2015**. *Frontiers in Immunology*, 6. [Acedido a 11 de abril de 2022]. Disponível na internet: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00412>.

Gerlach, S. [et al.] (2015). **Automated Evaluation of Crithidia luciliae Based Indirect Immunofluorescence Tests: A Novel Application of the EUROPattern-Suite Technology**. *Journal of Immunology Research*, 2015, 1–8. [Acedido a 11 de abril de 2022]. Disponível na internet: <https://doi.org/10.1155/2015/742402>.

Manual de Colheitas da ULS Guarda. (2021).

Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2020). **Medical Microbiology** (Elsevier, Ed.; 9th ed.). ISBN: 9780323673228.

Diário da República nº98. (2001). **Manual de Boas Práticas Laboratoriais**. [Acedido a 3 de maio de 2022]. Disponível na internet: [https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/qualidade/manual\\_de\\_boas\\_praticas\\_laboratoriais\\_despacho\\_8835\\_2001\\_\\_3595280995cb5f62196dbc.pdf](https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/qualidade/manual_de_boas_praticas_laboratoriais_despacho_8835_2001__3595280995cb5f62196dbc.pdf).

Owen, J., Punt, J., & Stranford, S. (2013). **Kuby Immunology** (Freeman, Ed.; 7th ed.). ISBN: 9781464119910.

Salvador, F. (2020). **ANCA associated vasculitis**. *European Journal of Internal Medicine*, 74, 18–28. [Acedido a 16 de abril de 2022]. Disponível na internet: <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2020.01.011>.

Sousa, J., Cerqueira, F., & Abreu, C. (2012). **Microbiologia: protocolos laboratoriais** (Edições Universidade Fernando Pessoa, Ed.).

Suwanchote, S. [et al.] (2018). **Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and their clinical significance**. *Clinical Rheumatology*, 37(4), 875–884. [Acedido a 16 de abril de 2022]. Disponível na internet: <https://doi.org/10.1007/s10067-018-4062-x>.

Tille, P. (2022). **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology** (Elvisier, Ed.; 15th ed.). ISBN: 9780323681056.

Tozzoli, R. [et al.] (2002). **Guidelines for the Laboratory Use of Autoantibody Tests in the Diagnosis and Monitoring of Autoimmune Rheumatic Diseases**. *American Journal of Clinical Pathology*, 117(2), 316–324. [Acedido a 25 de março de 2022]. Disponível na internet: <https://doi.org/10.1309/Y5VF-C3DM-L8XV-U053>.

ULS Guarda. (2022). [Acedido a 25 de maio de 2022]. Disponível na internet: <https://www.ulsguarda.min-saude.pt/>

