



Cátia Daniela Pereira Vale

## Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Doutora Paula Mota Vieira e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Cátia Daniela Pereira Vale

# Relatório de Estágio

## Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Doutora Paula Mota Vieira e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## **AGRADECIMENTOS**

Começo por agradecer à Professora Doutora Leonor Almeida pela dedicação, paciência e ajuda que me disponibilizou durante todo o mestrado, principalmente durante este último ano. Foi a sua persistência que tornou possível o meu estágio no Centro Hospitalar do Alto Ave – Unidade de Guimarães.

Agradeço também à Doutora Paula Mota Vieira, diretora do Serviço de Patologia Clínica do CHAA – Unidade de Guimarães por me ter aceite e me ter dado a oportunidade de aprender e conhecer a realidade de um laboratório hospitalar.

À Técnica Coordenadora Anabela Martins e ao Gilberto Ventura muito obrigado por todo o apoio, simpatia e preocupação que demonstraram durante estes cinco meses.

Aos restantes colegas com que trabalhei, tanto técnicos de análises como auxiliares e patologistas clínicos, muito obrigado por toda a ajuda e pelos conhecimentos que partilharam comigo, foi fundamental para o sucesso do estágio.

Importante também foi a ajuda da minha orientadora interna, a Professora Doutora Paula Cristina Luxo, a quem dirijo um agradecimento pela ajuda que me disponibilizou nesta reta final.

Agradeço aos meus pais pela confiança que depositaram em mim durante os cinco anos que estudei em Coimbra e estive longe de casa, pela força e motivação que sempre me deram para lutar pelos meus objetivos e por toda a educação e valores que me transmitiram e que fizeram de mim a pessoa que sou hoje.

À minha irmã agradeço a compreensão por não poder estar sempre presente e acompanhar alguns momentos importantes. Espero que o meu percurso académico possa ser um exemplo para ti.

Ao meu namorado um obrigado por sempre me apoiar e motivar e por toda a paciência e compreensão que teve nas alturas em que estive mais ausente.

Aos meus amigos muito obrigado pela vossa amizade e por tornarem os cinco anos enquanto estudante desta universidade ainda mais especiais.



## INDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	VII
<b>RESUMO</b> .....	IX
<b>ABSTRACT</b> .....	XI
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>DESCRIÇÃO DO SERVIÇO DE PATOLOGIA CLÍNICA</b> .....	3
<b>BIOQUÍMICA</b> .....	4
<b>IMUNOLOGIA</b> .....	7
<b>SEROLOGIA</b> .....	8
<b>HEMATOLOGIA</b> .....	9
<b>CÉLULAS SANGUÍNEAS</b> .....	10
➤ Eritrócitos.....	10
➤ Leucócitos.....	12
➤ Plaquetas.....	17
<b>HEMOGRAMA</b> .....	18
<b>LÍQUIDOS BIOLÓGICOS</b> .....	21
<b>ESFREGAÇO SANGUÍNEO</b> .....	21
<b>VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO</b> .....	22
<b>CITOMETRIA DE FLUXO</b> .....	23
➤ Populações linfocitárias.....	24
➤ Determinação de HLA-B27.....	24
<b>PESQUISA DE HEMOPARASITAS</b> .....	26
<b>COAGULAÇÃO</b> .....	27
<b>MICROBIOLOGIA</b> .....	28
<b>MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS</b> .....	29
<b>AMOSTRAS</b> .....	33
➤ Sangue.....	33
➤ Catéteres.....	35
➤ Expetoração e secreções brônquicas.....	35
➤ Lavados e aspirados brônquicos.....	38
➤ Urina.....	38
➤ Líquidos biológicos.....	40
➤ Fezes.....	40
➤ Exsudado purulento.....	41

➤ Exsudado vaginal .....	42
<b>TESTES DE IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS .....</b>	<b>43</b>
<b>TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS .....</b>	<b>45</b>
<b>PESQUISA DE <i>Helicobacter pylori</i> .....</b>	<b>47</b>
<b>PESQUISA DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS .....</b>	<b>47</b>
<b>TESTES DE BIOLOGIA MOLECULAR .....</b>	<b>48</b>
<b>CONTROLO DE QUALIDADE .....</b>	<b>49</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>55</b>

## ABREVIATURAS

- ATB – Antibiograma
- ATCC – *American Type Culture Collection*
- CA 125 – *Cancer antigen 125* (Antigénio cancerígeno 125)
- CA 153 – *Cancer antigen 153* (Antigénio cancerígeno 153)
- CA 199 – *Cancer antigen 199* (Antigénio cancerígeno 199)
- CD – *Cluster of differentiation antigen*
- CHAA – Centro Hospitalar do Alto Ave
- CIN – Cefsulidina, Irgasan e Novobiocina
- CLED – Cistina, lactose, deficiente em eletrólitos
- CMI – Concentração mínima inibitória
- DNA – *Desoxiribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)
- EPI – Equipamento de proteção individual
- EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilendiamino tetra-acético)
- EUCAST – *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
- FS – *Forward scatter* (Dispersão frontal)
- FSH – *Follicle-stimulating hormone* (Hormona folículo estimulante)
- GN – Gram negativo
- HCl – Ácido clorídrico
- HCT – Hematócrito
- HDL – *High Density Lipoprotein* (Lipoproteína de alta densidade)
- HIV – *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência humana)
- HLA – *Human leucocyte antigen* (Antigénio Leucocitário Humano)
- HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia líquida de alta pressão)
- IFI – Imunofluorescência indireta
- Ig – Imunoglobulina
- IL-5 – Interleucina 5
- LCR – Líquido cefalorraquideo
- LDH – *Lactate dehydrogenase* (Lactato desidrogenase)
- LH – *Luteinizing hormone* (Hormona Luteinizante)
- MCH – *Mean corpuscular hemoglobin* (Hemoglobina globular média)
- MCHC – *Mean corpuscular hemoglobin concentration* (Concentração média de hemoglobina globular)

MCV – *Mean cell volume* (Volume globular médio)  
MHC – *Major histocompatibility complex* (Complexo Major de Histocompatibilidade)  
MPV – *Mean platelet volume* (Volume plaquetar médio)  
MRSA – *Methicillin-resistant S. aureus* (*S. aureus* metilina resistentes)  
NEQAS – *National External Quality Assessment Service*  
NK – *Natural killer cells*  
PBP2a – *Penicillin binding protein 2a* (Proteína de ligação à penicilina 2<sup>a</sup>)  
PCR – *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia de polimerase)  
RBC – *Red blood cells* (Glóbulos vermelhos ou eritrócitos)  
RDW – *Red cell distribution width* (Distribuição do diâmetro dos eritrócitos)  
RIQAS – *Randox International Quality Assessment Scheme*  
RNA – *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)  
Rpm – Rotações por minuto  
RPR – *Rapid plasma reagin*  
SGC – Sabouraud com Gentamicina e Cloranfenicol  
SMAC – MacConkey com Sorbitol  
SPC – Serviço de Patologia Clínica  
SS – *Side scatter* (Dispersão lateral)  
SS – *Salmonella spp* e *Shigella spp*  
T3 – Triiodotironina  
T4 – Tiroxina  
TPHA – *Treponema pallidum hemagglutination*  
UCIC – Unidade de Cuidados Intensivos Cardíacos  
UCIP – Unidade de Cuidados Intensivos Polivalentes  
VCAT – Vancomicina, Colistina, Anfotericina e Trimetoprim  
VS – Velocidade de sedimentação

## RESUMO

As análises clínicas são um meio complementar de diagnóstico que consiste em exames laboratoriais realizados a pedido do médico, com o objetivo de diagnosticar, confirmar ou monitorizar uma patologia. Para a monitorização destas análises é fundamental a aquisição de conhecimentos sólidos que abrangem as diferentes áreas das ciências da saúde e o conhecimento da importância do laboratório no diagnóstico, tratamento, monitorização e prevenção da doença, na epidemiologia e no conhecimento das boas práticas laboratoriais e das questões éticas e legais.

Este relatório de estágio descreve as análises realizadas nas cinco valências principais do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Alto Ave – Unidade de Guimarães com especial incidência na Microbiologia e Hematologia, dado terem sido as áreas que me despertaram mais interesse. A Microbiologia por ser uma área de trabalho mais prática e que sempre me fascinou em todos os seus ramos, nomeadamente a bacteriologia que é mais comum na clínica mas também a parasitologia, micologia e virologia, e a Hematologia devido às diferentes células do sangue e patologias que envolve.

Além disso é feita uma breve descrição deste serviço, que inclui os profissionais que lá trabalham, o seu horário de funcionamento, o responsável, o fluxo e tipo de amostras e os espaços e salas de trabalho.

O relatório contempla também o tema do Controlo de Qualidade efetuado neste laboratório. O seu cumprimento e vigilância têm ganho cada vez mais importância e preocupação, uma vez que é a ferramenta que permite ao laboratório garantir a exatidão e precisão dos resultados que apresenta aos seus doentes e respetivos médicos.



## **ABSTRACT**

Clinical analysis are a complementary mean of diagnosis which consist on laboratory examinations ordered from an assigned doctor to diagnose, monitor or confirm a disease. These require the solid knowledge covering different areas of health sciences and help comprehend not only the importance of laboratory diagnosis, treatment, monitoring and disease prevention, epidemiology, but also the awareness of good laboratory practice and the ethical and legal issues regarding it.

This internship report describes the analysis carried out in the five main valences of *Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Alto Ave – Unidade de Guimarães* with special focus on Microbiology and Hematology, as these were the areas that aroused me more interest. Microbiology is one of them since it demands more practical tasks and has always fascinated me in all its different concepts, including bacteriology which is more common, but also parasitology, mycology, virology, and also Hematology because of the study of different blood cells and diseases it requires.

Apart from this, it is also made a brief description of this service, which includes the professionals who work there, their opening hours, the director, the flow and type of samples and the workrooms.

This report also mentions the Quality Control present in this lab, given that its compliance and monitoring have gained increasing importance and concern, since this is the tool that enables the laboratory to ensure the accuracy and precision of the results that offers its patients and respective doctors.



## INTRODUÇÃO

O Centro Hospitalar do Alto Ave é neste momento constituído apenas pelo Hospital de Guimarães e abrange os habitantes dos concelhos de Guimarães, Vizela, Fafe, Mondim de Basto e Cabeceiras de Basto, num total de aproximadamente 35 mil pessoas. Este tem como objetivo primordial prestar os melhores cuidados de saúde, com competência, rigor e excelência, apoiando também a formação e a investigação. Por essa razão contempla praticamente todas as áreas e serviços de prestação de cuidados de saúde, através dos cerca de 1700 profissionais que lá trabalham. Devido à sua constante preocupação pela garantia da qualidade, está acreditado pela *Joint Commission International* desde dezembro de 2008, contando já com reavaliações em maio de 2012 e em junho de 2015.

O Serviço de Patologia Clínica deste CHAA realiza análises laboratoriais no âmbito do diagnóstico e monitorização terapêutica, em diversos tipos de produtos biológicos. O seu funcionamento é assegurado durante 24 horas e conta com o apoio de médicos especialistas em patologia clínica ou especialistas em análises clínicas. O Sistema de Gestão de Qualidade integrado no âmbito da acreditação engloba programas de Controlo de Qualidade Interno e Externo e a Avaliação externa dos procedimentos e assegura a Formação Contínua dos seus colaboradores, garantindo a qualidade dos serviços prestados.

O meu estágio neste serviço, integrado no plano curricular do Mestrado em Análises Clínicas, teve a duração de cinco meses com início em janeiro de 2015 e término em maio. Por dia cumpri 7 horas, num total de cerca de 650 horas. Durante este estágio tive a oportunidade de trabalhar nos cinco setores principais: Microbiologia, Hematologia, Bioquímica, Imunologia e Serologia. Além disso, estive no Serviço de Sangue/Imunohemoterapia durante uma semana a fazer um estágio observacional. Este último serviço engloba a Coagulação, a Virologia (monitorização da carga viral e realização de PCR), determinação do sistema ABO/Rh e Imunofenotipagem associada a transfusões sanguíneas.



## DESCRIÇÃO DO SERVIÇO DE PATOLOGIA CLÍNICA

O Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Alto Ave (CHAA) - Unidade de Guimarães é dirigido pela Dra. Paula Mota Vieira – Médica Patologista Clínica e está organizado em cinco valências principais, sendo elas Microbiologia, Hematologia, Bioquímica, Serologia e Imunologia. Está equipado com aparelhos para garantir o diagnóstico correto e rápido das diversas patologias dos doentes e são recebidas diariamente amostras correspondentes a aproximadamente 1000 pedidos analíticos. Este serviço funciona durante 24 horas de modo a ser possível dar resposta ao Serviço de Urgência, Urgência do Internamento, Internamento e Consulta Externa.

O laboratório do SPC emprega 6 médicos especialistas em Patologia Clínica, 2 técnicos superiores de saúde especialistas em Análises Clínicas (farmacêuticos), 17 técnicos de Análises Clínicas e Saúde Pública, assistentes técnicos e assistentes operacionais. Este é constituído pela receção/secretariado, pela sala de espera, pela sala de colheitas, por uma sala de reuniões, por gabinetes, pelos laboratórios de Microbiologia, de Imunologia, de Serologia infecciosa/Biologia molecular e de Citometria de fluxo, e por um espaço comum denominado CoreLab que compreende as áreas de Bioquímica, Serologia e Hematologia (onde é realizado 90% do volume de amostras).

Neste serviço, os doentes marcam de forma presencial as suas análises no âmbito de uma consulta externa ou numa situação pré-operatória. No dia da marcação dirigem-se ao laboratório para efetuar a colheita de sangue. São também feitas colheitas no serviço de urgência e no internamento por enfermeiros, que são depois reencaminhadas para o laboratório. Todo o serviço está devidamente informatizado pelo sistema *Clinidata*<sup>®</sup>, que engloba a requisição de análises, a identificação e impressão dos códigos de barras, e a integração e validação dos resultados pelos patologistas.

Na colheita de sangue é retirado sangue venoso da veia cubital para um máximo de quatro tubos, sendo estes para a hematologia, bioquímica, imunologia/serologia e para o serviço de sangue. As amostras para a microbiologia podem ser trazidas pelo doente, quando solicitadas na Consulta Externa, como é o caso da urina ou das fezes, ou colhidas na Urgência ou no Internamento, tal como os lavados e aspirados brônquicos, pús, LCR, entre outros.

## BIOQUÍMICA

O setor de bioquímica tem como principal objetivo o doseamento das várias substâncias que podem ser encontradas nos fluidos corporais (soro ou plasma, urina, LCR, líquido ascítico, líquido pleural), sendo o soro a amostra mais utilizada. Estas substâncias incluem enzimas, iões, proteínas, hormonas, marcadores cardíacos e tumorais, e fármacos.

Este setor está munido de uma cadeia automatizada *StreamLAB* que realiza as fases pré e pós-analítica, a centrifugação e descapsulação das amostras, e as encaminha para os aparelhos *Vista 1500* da *Siemens*<sup>TM</sup>, *ADVIACentaur*<sup>®</sup>*XP* e/ou *Immolute 2000 Xpi*, de acordo com os parâmetros de análise pedidos.

As análises deste setor são realizadas em amostras de soro no *Vista 1500* da *Siemens*<sup>TM</sup>, havendo dois aparelhos destes no laboratório dado o fluxo de amostras elevado, no *ADVIACentaur*<sup>®</sup>*XP* e no *Cobas e411*.

Na tabela I estão descritos quais os parâmetros analisados no *Vista 1500* da *Siemens*<sup>TM</sup> e os respetivos métodos usados para a sua determinação.

Metodologia	Parâmetro
<u>Espetrofotometria</u>	Alanina aminotransferase, Amilase, Fostatase alcalina, Aspartato aminotransferase, Cálcio, Bilirrubina direta e total, Gama glutamil transferase, Glucose, Ferro, Lipase, Magnésio, Fósforo, Capacidade total de ligação do ferro, Proteína total, Triglicéridos, Ácido úrico, Creatina cinase, Creatinina, Lactato desidrogenase, Benzodiazepinas.
<u>Quimioluminescência</u>	Alfa-fetoproteína, Troponina, Antígeno carcinoembrionário, Digoxina, Ferritina, Ácido fólico, Antígeno específico da próstata, T3 livre, T4 livre, Mioglobina, Peptídeo natriurético cerebral, Hormona estimulante da tiróide, Hormona gonadotrofina coriónica.

<u>Turbidimetria</u>	Carbamazepina, Gentamicina, Fenobarbital, Vancomicina.
<u>Imunoensaio</u>	T3 total, T4 total, Transferrina, Proteína C reativa
<u>Potenciometria</u>	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup>

Tabela I – Análises e metodologias do *Vista 1500*.

A Endocrinologia (pesquisa de hormonas e marcadores tumorais) é realizada nos aparelhos *Cobas e411* e *ADVIACentaur®XP* que efetuam determinações quantitativas e qualitativas. O primeiro é usado para determinação de procalcitonina e tiroglobulina e tem como método a imunoquímica – técnica de sandwich, enquanto que os parâmetros quantificados pelo segundo, através de quimioluminescência, são:

- ✓ Vitamina B12
- ✓ Hormonas sexuais: LH, FSH, Progesterona, Testosterona e 17-β estradiol
- ✓ Hormona paratiroideia
- ✓ Prolactina
- ✓ Marcadores tumorais: CA 153, CA 125 e CA 199
- ✓ Insulina

No *Vista 1500* da *Siemens™* são também realizadas várias análises em amostras de urina, nomeadamente a quantificação de potássio, cálcio, sódio, cloreto, creatinina, glucose, ureia, ácido úrico, albumina e amilase. Nestas análises podem ser usadas amostras de urina ocasional, primeira urina da manhã ou urina das 24 horas, dependendo do parâmetro e da finalidade da análise.

Em amostras de urina faz-se também a pesquisa de drogas de abuso e o teste imunológico de gravidez através de testes rápidos imunocromatográficos.

A análise denominada Urina Tipo II compreende o exame químico da urina, realizado no *AutionMax* e a análise ao sedimento urinário, no *SediMax*. Estes aparelhos estão acoplados e funcionam em cadeia dado que, após o exame químico, as amostras são diretamente encaminhadas para o *SediMax*. No exame químico procede-se à deteção de bilirrubina, urobilinogénio, cetonas, nitritos e sangue, sendo o resultado dado como positivo ou negativo. São detetados também glucose, proteínas e leucócitos, fazendo a sua quantificação nos casos positivos, e realizada a medição do pH. Estes parâmetros são analisados através de

uma tira de teste que é mergulhada na urina. Além disso pesquisa a existência de turvação e determina a cor e densidade da urina. Após esta análise as amostras são reencaminhadas para o *SediMax* onde são sujeitas a uma centrifugação, sendo as imagens microscópicas do sedimento resultante visualizadas no ecrã de um computador ligado ao aparelho. Além de serem visualizados, o aparelho procede à contagem de leucócitos, eritrócitos, células epiteliais, cristais e cilindros, entre outros. Todas as imagens são revistas, corrigidas e validadas.

Neste setor é utilizado o aparelho *RAPID Point® 500* para estudar o equilíbrio ácido-base e hidroeletrólítico e o funcionamento do sistema de transporte de oxigénio dos doentes, através da realização de gasometrias em amostras de sangue total capilar, arterial e venoso. São quantificados vários parâmetros entre os quais o pH, pressão de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, glucose, lactato, iões (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>) e hemoglobina e seus derivados. O sistema utiliza potenciometria, amperometria e condutância para medir as concentrações de analitos nas amostras. Uma das vantagens é fornecer resultados em tempo útil, o que permite que a equipa médica tome decisões mais rápidas relativas ao tratamento e, dessa forma, melhore a qualidade do atendimento ao doente.

Também são feitas eletroforeses capilares no *Capillarys 2* da *Sebia* onde se obtém o perfil eletroforético das proteínas existentes no soro, separadas nas respetivas frações. As amostras são injetadas nos capilares, migram numa placa e as frações resultantes são detetadas por um sensor através de espectrofotometria de absorção. Os perfis eletroforéticos resultantes são visualizados no computador e analisados pelo patologista responsável. Além destas, neste aparelho são também realizadas imunoeletroforeses após a imunosubtração da fração das imunoglobulinas.

São realizadas neste setor imunofixações em gel de agarose para pesquisa de imunoglobulinas monoclonais, quando for detetado um pico monoclonal na eletroforese ou quando houver suspeita clínica de alguma gamapatia monoclonal maligna.

É também feita a quantificação da Hemoglobina glicada, ou seja Hemoglobina A1c, em amostras de sangue total por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) no aparelho *Adams™ A1c*.

## IMUNOLOGIA

Este setor é constituído pelas áreas de Autoimunidade, Imunidade Humoral e Alergologia. Cada área desempenha funções específicas, tendo para isso equipamento e técnicas adequadas, mas em todas elas a base está na detecção de antígenos e de anticorpos. Ao laboratório de imunologia chegam produtos como sangue/soro, urinas, LCR, entre outros fluidos corporais.

A Alergologia é realizada no *Immulite 2000 Xpi*, quantifica a IgE total e pesquisa a existência de alérgenos inalantes (AlaTop) e alérgenos alimentares (FP5). Quando um destes alérgenos é positivo, o médico pode pedir para pesquisar a IgE específica, ou seja, qual o alérgeno específico em causa.

Na Imunologia é feita a quantificação de cadeias leves ( $\kappa$  e  $\lambda$ ) no soro e/ou na urina por imunonefelometria no *BN Siemens*, e a quantificação de imunoglobulinas e proteínas no *Vista 1500 da Siemens™* da Bioquímica:

- ✓ Imunoglobulinas: IgM, IgA, IgG (subclasses: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)
- ✓ Fator reumatóide
- ✓ Proteínas do complemento: C3, C4, CH50
- ✓ Proteínas:  $\alpha$ -2 Macroglobulina,  $\alpha$ -1 Antitripsina, Ceruloplasmina, Haptoglobina,  $\beta$ -2 Microglobina
- ✓ Título de antiestreptolisina O

Na Auto-imunidade pesquisa-se a presença de auto-anticorpos no *ImmunoCAP 250*, pelo método de ELISA por técnica de FEIA:

- ✓ anti-tiroglobulina
- ✓ anti-peroxidase tiroideia
- ✓ anti-gliadina (IgG e IgA)
- ✓ anti-transglutaminase (IgG e IgA)
- ✓ anti-DNA de dupla cadeia
- ✓ anti-proteinase 3
- ✓ anti-mieloperoxidase
- ✓ anti-membrana basal glomerular
- ✓ anti-cardiolipina (IgG e IgM)

- ✓ anti-β2 glicoproteína I (IgG e IgM)
- ✓ anti-antígenos nucleares solúveis

Pesquisa-se também por Imunofluorescência indireta (IFI) a presença de anticorpos anti-nucleares, anti-músculo liso, anti-célula parietal e anti-citoplasma do neutrófilo. As lâminas são preparadas no *BIORAD PhD* e visualizadas no microscópio de fluorescência pelo patologista responsável.

Além disso, são pesquisados de forma manual os chamados DOTs hepáticos, que são auto-anticorpos IgG contra a mitocôndria, M2, LKMI, SLA e actina F. Esta pesquisa é feita de forma manual através de um kit baseado no método de imunoenensaio enzimático.

## SEROLOGIA

A Serologia compreende a Serologia infecciosa e a Serologia manual e as análises são realizadas em amostras de soro.

A Serologia Infecciosa consiste na pesquisa de anticorpos IgM e/ou IgG contra:

- ✓ Citomegalovírus, Rubéola e *Toxoplasma spp*, através de um imunoenensaio quimioluminescente no *Immulate 2000 XPi*;
- ✓ *Clamidia trachomatis*, *Clamidia pneumoniae*, *Treponema pallidum*, *Rickettsia conorii*, *Legionella pneumophila* e Adenovírus, pelo método de ELISA no *EtiMax 3000*;
- ✓ *Mycoplasma spp*, *Borrelia spp*, Vírus Varicela Zoster, Vírus Herpes Simplex e Vírus Epstein-Barr, no *Liaison*<sup>®</sup> por quimioluminescência;
- ✓ Sífilis (*Treponema pallidum*) no *ADVIACentaur*<sup>®</sup>*XP*, por quimioluminescência.

A serologia manual abrange os seguintes testes:

- ✓ O teste RPR para pesquisa de lípidos da superfície celular de *Treponema pallidum* e de lípidos das células infetadas do hospedeiro (reaginas), através de uma reação de aglutinação;
- ✓ O teste TPHA para pesquisa de antígenos de *Treponema pallidum*, por hemaglutinação;
- ✓ A Reação de Widal para pesquisa dos antígenos O e H de *Salmonella typhi* e do H de *Salmonella paratyphi B*, através de uma reação de aglutinação antígeno-anticorpo;

- ✓ A Reação de Wright para pesquisa de antígenos de *Brucella spp*, através de uma reação de aglutinação antígeno-anticorpo;
- ✓ A Reação de Whiel-Felix para pesquisa dos antígenos OX2, OX19 e OXK de *Proteus spp*, através de uma reação de aglutinação antígeno-anticorpo;
- ✓ A pesquisa de *Leptospira spp* por um teste rápido imunocromatográfico;
- ✓ O Monoteste, um teste de aglutinação para pesquisa de anticorpos heterófilos contra o vírus Epstein-Baar, causador de Mononucleose infecciosa.

## **HEMATOLOGIA**

O sangue é o líquido mais abundante no nosso corpo uma vez que cada ser humano possui aproximadamente 5 litros deste no seu organismo. É composto por plasma e por células sanguíneas. Estas células são os eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas, tendo cada uma delas um papel importante e diferente na defesa da saúde humana. Por esta razão é fundamental estudá-las através da sua quantificação, das suas características e da sua morfologia para um diagnóstico correto, precoce e eficaz de qualquer anomalia que estas possam apresentar.

Quanto ao plasma, contém todas as proteínas e fatores necessários para a integridade do organismo, tal como fatores de coagulação, proteínas de transporte, imunoglobulinas e hormonas, sendo que o composto mais abundante é a albumina [1].

Na área de Hematologia estuda-se o sangue, as alterações das suas células e todas as patologias com elas relacionadas. São também analisados os líquidos cefalorraquídeo, pleural e ascítico. É realizado o hemograma, e caso seja pedido, a contagem de reticulócitos e de plaquetas por fluorescência. Além disso, são realizados esfregaços de sangue, determinação da velocidade de sedimentação, realização de citometria de fluxo (onde se fazem populações linfocitárias e determinação de HLA-B27) e a pesquisa de hemoparasitas.

No CHAA o estudo e a realização das provas de coagulação não é realizado na Patologia Clínica mas sim no Serviço de Sangue/Imunohemoterapia. Dado que apenas realizei um pequeno estágio observacional nesse serviço este tema não vai ser aprofundado.

Neste serviço de hematologia a validação do hemograma está integrada num sistema automatizado denominado EPU, que está diretamente ligado aos dois aparelhos Sysmex XN-1000 do laboratório. Neste sistema estão integradas regras criadas no serviço para a

validação automática ou para a retenção de resultados, com realização de ações técnicas, realização de esfregaço sanguíneo e validação biopatológica.

## CÉLULAS SANGUÍNEAS

As células sanguíneas são formadas na medula óssea a partir de uma célula estaminal hematopoiética pluripotente que dá origem a uma linhagem mielóide e uma linhagem linfóide. Na linhagem linfóide são produzidas células que vão maturando até serem formados linfócitos. A linhagem mielóide é posteriormente separada em quatro sub-linhagens em que as células finais são os eritrócitos, os monócitos, os granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e as plaquetas.

### ➤ Eritrócitos

Os eritrócitos, também denominados de glóbulos vermelhos ou hemácias, são células bicôncavas com diâmetro entre 7,5 e 8,7 $\mu$ m e com um tempo médio de vida de 120 dias. São células anucleadas, viscoelásticas e com cor vermelha, devido ao seu teor de hemoglobina que, em situações normais, ronda os 90%.

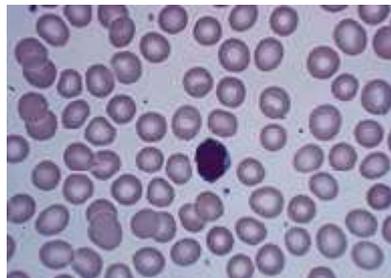


Figura 1 – Eritrócitos

Fonte: [2]

Os eritrócitos são formados na medula óssea através da eritropoiese pela maturação sucessiva dos seus precursores, sendo as células finais da linhagem eritróide.



Figura 2 – Eritropoiese

Estas células têm como funções as passagens repetidas pela microcirculação, a manutenção da hemoglobina no estado ferroso, ou seja protegê-la contra a oxidação, e a manutenção do equilíbrio osmótico. Nas passagens pela microcirculação são realizadas as trocas gasosas em que o  $O_2$  é transportado para os tecidos e o  $CO_2$  retirado destes [3].

A molécula de hemoglobina é constituída por duas cadeias polipeptídicas ligadas por ligações não covalentes e é sintetizada na sua maioria no eritroblasto, enquanto que a restante é no reticulócito. A hemoglobina A é a mais abundante no ser humano (96-98%) e é constituída por duas cadeias  $\alpha$  e duas  $\beta$ . Além disso, cada cadeia está ligada covalentemente a um grupo heme que é constituído pela protoporfirina IX e por  $Fe^{2+}$ , onde se liga o  $O_2$ .

Apesar da forma normal dos eritrócitos ser bicôncava, estes podem apresentar diferentes formas em função de certas patologias que ocorram:

- ✓ Esferócitos – Eritrócitos esféricos com hemoglobina mais densa, característicos em casos de esferocitose hereditária e anemia hemolítica;
- ✓ Eliptócitos – Eritrócitos longos e ovais existentes em patologias como eliptocitose hereditária, talassémia, anemia por deficiência de ferro e anemia megaloblástica;
- ✓ Acantócitos – Células irregulares e espiculadas que podem ser associadas a situações de má absorção e de doenças hepáticas causadas pelo álcool;
- ✓ Drepanócitos – Eritrócitos com forma irregular mas na sua maioria oval e achatada em forma de foice e com espículas, característica da anemia falciforme;
- ✓ Células em alvo – Eritrócitos com uma zona central com cor, rodeada por um anel descorado, que por sua vez é contornado por uma zona novamente com a cor normal. Relacionadas com doença hepática obstrutiva talassémia, anemia por deficiência de ferro e hemoglobinopatias [3].

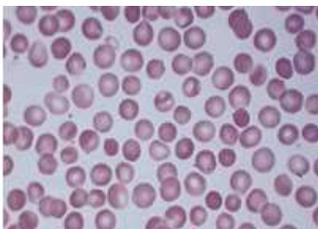


Figura 3 – Esferócitos  
Fonte: [2]

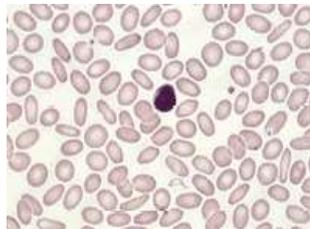


Figura 4 – Eliptócitos  
Fonte: [2]

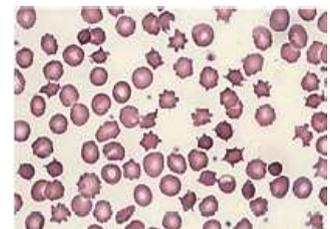


Figura 5 – Acantócitos  
Fonte: [2]

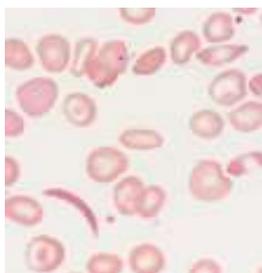


Figura 6 – Drepanócito  
Fonte: [4]

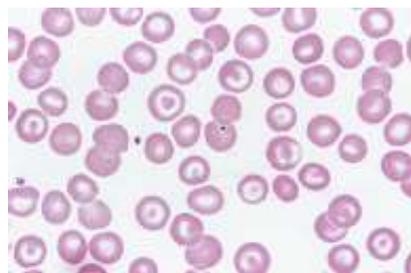


Figura 7 – Células em alvo  
Fonte: [4]

Além disso, os eritrócitos podem apresentar-se hipocrômicos, normocrômicos ou hiperocrômicos consoante o teor em hemoglobina que vai aumentar ou diminuir a cor, e microcíticos, normocíticos ou macrocíticos dependendo do seu tamanho.

Os eritrócitos podem também sofrer inclusões atípicas, associadas a diversas patologias:

✓ Corpos de Howell-Jolly – São pequenos fragmentos nucleares com cor característica dos núcleos picnóticos e estão distribuídos de forma aleatória, normalmente só um por eritrócito. Podem estar presentes em doentes com anemia megaloblástica;

✓ Ponteado basófilo – Consiste em granulações azuis com tamanho e número variado inseridos no eritrócito, que são precipitados de RNA citoplasmático. Estes ponteados são característicos de eritrócitos mais imaturos, podendo ocorrer em situações de talassémia e intoxicação por chumbo [3].



Figura 8 – Corpos de Howell-Jolly  
Fonte: [4]

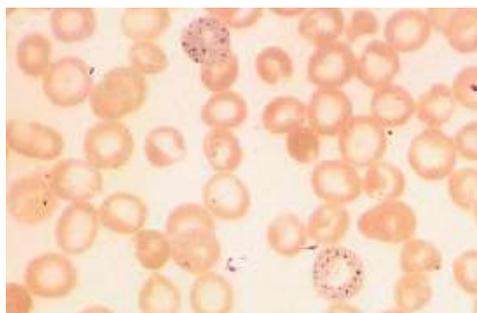


Figura 9 – Ponteado basófilo  
Fonte: [5]

### ➤ Leucócitos

Os leucócitos podem ser divididos em linfócitos, monócitos e granulócitos, do qual fazem parte os neutrófilos, os eosinófilos e os basófilos.

A série granulócita, representada na figura 2, é caracterizada pelos grânulos citoplasmáticos das células, principalmente das maduras, e pelas mudanças nos seus núcleos

durante a maturação. A sua principal função é a de defesa do organismo. Estes são produzidos na medula óssea e quando entram na circulação sanguínea, movem-se entre os diferentes tecidos consoante as necessidades de defesa [6].



Figura 10 – Maturação dos granulócitos

a) Neutrófilos

Os neutrófilos são células esféricas e diferenciadas, com uma duração média de vida relativamente curta e possuem uma vasta gama de recetores de superfície para conseguir responder a estímulos inflamatórios e fagocíticos. O seu núcleo é constituído por 3 a 5 lóbulos, separados por uma banda fina de cromatina, e o seu citoplasma é abundante em granulações neutrófilas [6].



Figura 11 – Neutrófilo

Fonte: [5]

Os seus grânulos citoplasmáticos possuem vários fatores que são ativados em situações de inflamação, reparação de tecidos e resistência a infeções microbianas. Estes podem ser divididos em quatro grupos, relacionados com a biossíntese das diferentes proteínas granulares que lhes deram origem: grânulos primários (ex: mieloperoxidase), grânulos secundários (ex: lactoferrina), grânulos terciários (ex: lisozima) e vesículas secretoras (proteínase 3) [6].

Os neutrófilos que circulam no sangue não estão ainda no seu estado final de maturação mas desempenham a sua função quando estimulados por citocinas e quimiocinas, alterando o seu fenótipo [6].

A diminuição destas células na corrente sanguínea é denominada de neutropenia, enquanto o seu aumento de neutrofilia. Estas variações podem estar relacionadas com

diversas patologias, quer diretamente relacionadas com estas células (tal como a leucemia mielóide) quer relacionadas com outras células sanguíneas mas que afetam também os neutrófilos (linfomas e anemias).

b) Eosinófilos

Os eosinófilos são células esféricas com aproximadamente 8  $\mu\text{m}$  de diâmetro, possuem um núcleo com dois lobos, contêm grânulos específicos eosinófilos que são maiores que os restantes não-específicos e a sua produção e função é extremamente influenciada pela IL-5 [6].



Figura 12 – Eosinófilo

Fonte: [5]

Os eosinófilos estão relacionados com reações de hipersensibilidade, nomeadamente alergias, e com infeções causadas por helmintas (parasitas macroscópicos). Estas reações por norma são eficazes mas podem causar danos nos tecidos associados.

O seu aumento, designado por eosinofilia, está muitas vezes associado a doenças caracterizadas por respostas imunes mediadas por células Th2, tal como infeção por helmintas e asma [6].

c) Basófilos

Os basófilos são os leucócitos menos frequentes na circulação sanguínea e circulam como células maduras que podem ser recrutadas para os tecidos, em situações de respostas imunes ou inflamatórias. Expressa na sua superfície um receptor de alta afinidade para IgE ( $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ ) que lhe confere a capacidade de libertar mediadores, na presença de alergéneos, através da sua ativação. Além disso pode desempenhar funções imunorregulatórias através da produção de citocinas [6].

Possuem um núcleo com 3 lobos e o seu citoplasma é abundante em granações basófilas.

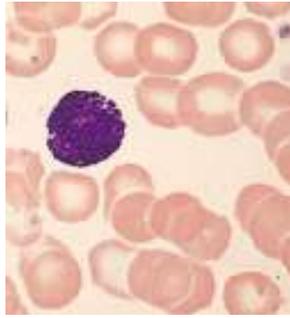


Figura 13 – Basófilo

Fonte: [5]

A deficiência primária em basófilos é um acontecimento raro e patologias associadas ao aumento destas células estão normalmente relacionadas com neoplasias mieloproliferativas ou leucemias mielóides [6].

d) Monócitos

Os monócitos são células esféricas com ondulações na sua superfície. O seu citoplasma é cinzento-azulado e contém muitas mitocôndrias, microtúbulos, microfilamentos e granulações finas e azurofílicas.

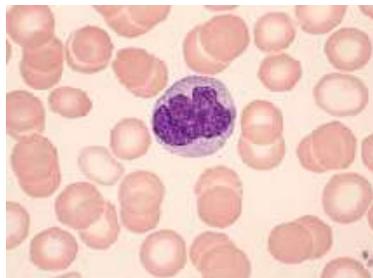


Figura 14 – Monócito

Fonte: [5]

Quando os monócitos entram nos tecidos diferenciam-se em macrófagos e aumentam o seu volume celular e o número de grânulos citoplasmáticos. A sua forma pode variar dependendo do tecido onde o macrófago se encontra.

Uma das características do monócito efetivo é a capacidade de migrar e de se acumular nos locais de infeção e inflamação, devido à quimiotaxia. Além disso, tem como função a defesa do organismo através da fagocitose e digestão intracelular de microrganismos e células danificadas [7].

Na figura 15 está representada a maturação dos monócitos:

Monoblasto → Promonócito → Monócito

Figura 15 – Maturação dos monócitos

e) Linfócitos

Os linfócitos podem ser classificados em linfócitos B e T e células NK. Os dois primeiros são muito semelhantes morfológicamente e a diferença reside nos diferentes antígenos que cada um possui à superfície. São células esféricas com diâmetro entre 6 e 9µm, em que o núcleo ocupa cerca de 90% do seu volume [8].

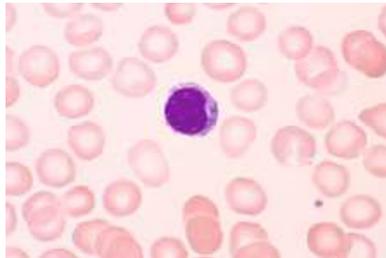


Figura 16 – Linfócito  
Fonte: [5]

Em situações de infecção aguda os linfócitos são ativados, o que origina uma ligeira alteração da sua morfologia e um aumento do seu tamanho (que será entre os 9 e os 15µm). São produzidos no timo, na medula óssea, nos nódulos linfáticos e no baço, num processo chamado linfopoiese [8].

Linfoblasto → Prolinfócito → Linfócito

Figura 17 – Linfopoiese

Os linfócitos T são responsáveis por reações citotóxicas mediadas por células e por respostas tardias de hipersensibilidade, produzindo também citocinas que irão regular respostas imunes e ativar a atividade dos linfócitos B. Os linfócitos B têm a função de apresentação dos antígenos aos linfócitos T e levam à produção dos anticorpos

(imunoglobulinas). As células NK exercem a sua ação durante a resposta imune através da destruição e eliminação de agentes infecciosos [8].

### ➤ **Plaquetas**

A produção de plaquetas depende da proliferação e diferenciação do sistema hematopoiético e das suas células progenitoras, durante a megacariopoiese.

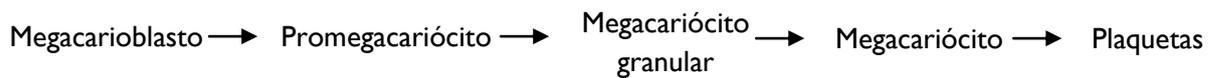


Figura 18 – Megacariopoiese

As plaquetas são pequenos fragmentos anucleados resultantes da destruição do megacariócito e apresentam vários grânulos na sua morfologia. O seu diâmetro varia entre os 1,5 e 3µm. As plaquetas têm a capacidade de aderir aos vasos sanguíneos danificados, de se agregarem entre elas e de facilitar a produção de trombina, sendo estas ações que facilitam e contribuem para a hemostase [9].

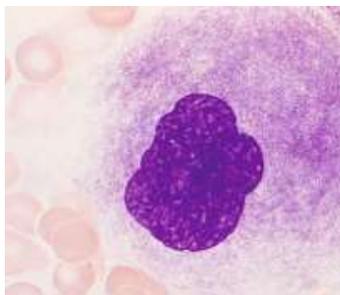


Figura 19 – Megacariócito  
Fonte: [5]

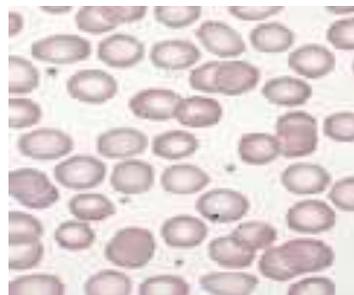


Figura 20 – Plaquetas (células de menor dimensão)  
Fonte: [2]

O seu decréscimo é denominado de trombocitopenia e pode causar hemorragias descontroladas, enquanto que a trombofilia, ou seja o seu aumento, pode causar obstrução dos vasos sanguíneos e consequentemente trombozes [9].

## HEMOGRAMA

As amostras de sangue venoso são colhidas a partir da veia cubital para um tubo com 1,2mg de EDTA/ml de sangue. O EDTA é um anticoagulante que exerce um efeito quelante sobre as moléculas de cálcio presentes no sangue, evitando dessa maneira a cascata de coagulação [10].

O *Sysmex XN-1000* é o aparelho usado para a realização do hemograma e engloba todos os parâmetros apresentados na tabela 2. Tal como já foi referido existem dois aparelhos, sendo que apenas um permite a contagem de reticulócitos e de plaquetas por fluorescência.

<b>Eritrócitos</b>	<b>Leucócitos</b>	<b>Plaquetas</b>
Contagem de eritrócitos	Contagem de leucócitos	Contagem de plaquetas
Hemoglobina	Fórmula leucocitária	Volume plaquetar médio
Hematócrito	Contagem de granulócitos imaturos	Contagem de plaquetas por fluorescência
Volume globular médio		
Hemoglobina globular média		
Concentração média de hemoglobina globular		
Distribuição do diâmetro dos eritrócitos		
Contagem de reticulócitos		
Contagem de eritroblastos		

Tabela 2 – Parâmetros do hemograma

O seu funcionamento compreende duas técnicas, a impedância e a citometria de fluxo com fluorescência.

Primeiramente determinam-se os parâmetros relacionados com os eritrócitos e com as plaquetas por impedância. Os eritrócitos são convertidos a esferócitos (para eliminar a variedade das formas destes) e, ao passarem um a um pelo feixe de luz, é feita a sua

contagem. A determinação do tamanho destes é estimada através da medição de mudanças na resistência elétrica, enquanto que na quantificação da hemoglobina há oxidação do grupo heme ( $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ ) e a absorção deste é medida a 550nm. A contagem de plaquetas é feita do mesmo modo mas numa janela específica de volume (2-300 fl) dado o seu tamanho reduzido em comparação com as restantes células sanguíneas.

De seguida os eritrócitos são lisados para ser possível fazer as quantificações relativas aos glóbulos brancos, uma vez que esta lise não afeta a integridade da sua membrana. A contagem de glóbulos brancos é realizada pelo mesmo método de impedância, contudo a fórmula leucocitária é realizada por citometria de fluxo com fluorescência. Assim, a diferenciação dos leucócitos é feita através da marcação por fluorescência dos seus ácidos nucleicos e no scattergram as células são separadas de acordo com a sua estrutura interna e fluorescência emitida. A intensidade do sinal de fluorescência é diretamente proporcional ao conteúdo de DNA e RNA presentes [11].

A contagem de eritrócitos (RBC) e a concentração de hemoglobina no sangue são dois dos parâmetros mais simples mas também mais importantes para nos indicar se há alguma alteração a nível dos eritrócitos. O volume globular médio, ou MCV, é o volume médio que cada eritrócito ocupa no sangue. Os restantes parâmetros eritrocitários são calculados a partir do resultados destes três [11].

O hematócrito (HCT) é o volume de sangue ocupado pelos eritrócitos e é calculado pela multiplicação entre o número de eritrócitos e o volume globular médio [11].

$$HCT = RBC \times MCV$$

A hemoglobina globular média (MCH) indica-nos a quantidade média de hemoglobina por glóbulo vermelho e é-nos dada pela relação entre a concentração de hemoglobina e o número de eritrócitos [11].

$$MCH = \frac{\text{Hemoglobina}}{\text{Número de eritrócitos}}$$

A concentração média de hemoglobina globular (MCHC), ou seja, a concentração de hemoglobina por volume médio de cada eritrócito, é calculada pela relação entre a concentração de hemoglobina e o hematócrito [11].

$$MCHC = \frac{\text{Hemoglobina}}{\text{Hematócrito}}$$

A distribuição do diâmetro dos eritrócitos (RDW) permite-nos concluir acerca da variação do seu tamanho, pelo que é uma ferramenta útil no diagnóstico da anisocitose eritrocitária (presença de macro e microcitose simultaneamente). Além disso um valor

anormal pode dar a suspeita de que é necessário visualizar um esfregaço sanguíneo da amostra em questão, para verificar se a contagem e os parâmetros eritrocitários do aparelho estão corretos.

O aparelho Sysmex também realiza a contagem de reticulócitos, uma análise que não é efetuada de rotina mas apenas quando é pedida pelo médico. Os reticulócitos são as células precursoras dos eritrócitos e o que as distingue destes é o facto de possuírem quantidades residuais de RNA. A sua quantificação permite-nos avaliar a produção de eritrócitos na medula óssea, útil em situações de anemia. Esta é realizada pelo método de citometria de fluxo com fluorescência e o sinal emitido é diretamente proporcional à quantidade de ácidos nucleicos dos reticulócitos. É quantificado o número total de reticulócitos [4].

Ainda nos parâmetros relativos aos eritrócitos temos a contagem (em valor absoluto e percentagem) de eritroblastos, as células imaturas e precursoras dos eritrócitos.

Quanto aos glóbulos brancos, as células fundamentais do sistema imunológico humano, o aparelho permite-nos saber a sua contagem total e a contagem de cada tipo (neutrófilos, eosinófilos, monócitos, basófilos e linfócitos) e dos granulócitos imaturos, ambos em número e em percentagem.

A contagem total de leucócitos pode ter um resultado falso aumentado devido à presença de eritrócitos não-lisados e de plaquetas agregadas (podem ser confundidas com estes), e um falso diminuído devido a neutrófilos agregados (induzido pelo EDTA) [11].

Como cada tipo de leucócito desempenha um papel diferente no nosso organismo e provém de linhagens hematopoiéticas diferentes é importante quantificar cada um. A sua quantificação é feita pelo método de citometria de fluxo através da marcação por fluorescência dos seus ácidos nucleicos [11].

Também são quantificados os granulócitos imaturos que eventualmente possam existir na amostra de sangue. Esta análise é realizada pelo mesmo princípio da fórmula leucocitária e é importante para a clínica nomeadamente na monitorização de pacientes com infeção e/ou inflamação e em casos de imunossupressão [6;11].

No caso da contagem de plaquetas, pode acontecer um resultado falso devido à acção incompleta do anticoagulante que pode formar coágulos de fibrina, à agregação de plaquetas, ao “satelitismo” (plaquetas aderem à superfície dos neutrófilos) e à existência de fragmentos leucocitários e de eritrócitos microcíticos que podem ser confundidos com plaquetas [11].

Além da contagem é também realizada a determinação do MPV, o volume plaquetar médio, uma ferramenta importante no diagnóstico de trombocitopenias. Caso o patologista do laboratório ache relevante, mediante o resultado obtido no hemograma, pode ser feita a contagem de plaquetas por fluorescência, um método alternativo para a sua contagem que também determina a existência de plaquetas imaturas. Este consiste em citometria de fluxo por fluorescência, onde o sinal de fluorescência é diretamente proporcional ao grau de imaturidade das plaquetas. É útil no controle da trombocitopoiese e no diagnóstico de trombocitopenias [11].

## LÍQUIDOS BIOLÓGICOS

Além do hemograma, o *Sysmex XN-1000* também processa outros líquidos, como LCR, líquido ascítico e pleural. Esta análise, por citometria de fluxo com fluorescência, consiste na contagem dos seguintes parâmetros: eritrócitos, glóbulos brancos, células mononucleares (linfócitos e monócitos), células polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) e células de elevada fluorescência (macrófagos e células epiteliais e tumorais).

Além da contagem no aparelho, os líquidos são sempre contados em Câmara de Neubauer para confirmar o resultado, e se necessário é realizado um citoesfregaço para confirmação. Todas as contagens do aparelho e realizadas manualmente são validadas pelo patologista responsável.

Esta análise é uma ferramenta útil quando utilizada em conjunto com análises bioquímicas e microbiológicas para uma melhor interpretação dos resultados mas também para excluir ou prever um possível diagnóstico.

## ESFREGAÇO SANGUÍNEO

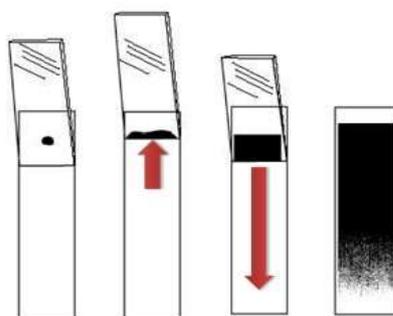


Figura 21 – Realização de um esfregaço sanguíneo  
Fonte: [12]

Após a realização do hemograma os resultados são analisados e comparados com os valores de referência existentes. Caso algum parâmetro não esteja concordante com estes pode ser pedida a realização de um esfregaço sanguíneo pelo patologista do laboratório. É sempre relevante consultar a história clínica do doente em questão, assim como o histórico de resultados anteriores. Há também certos critérios estabelecidos no laboratório e pelo sistema informático, que nos dão o alerta para a possível necessidade de realização de um esfregaço nomeadamente quando o valor dos granulócitos imaturos é superior a  $5 \times 10^3/\text{ml}$ , em situações de trombocitopenia, leucopenia, anemia, linfopenia ou leucocitose.

Um esfregaço sanguíneo permite-nos visualizar a morfologia e o aspeto das células sanguíneas, para diagnosticar ou confirmar a suspeita de alguma patologia. Para a visualização ao microscópio eletrónico ser possível é necessário realizar uma coloração sobre a amostra presente na lâmina.

Neste laboratório é feita a coloração de Wright modificada no dispositivo automático *RAL Diagnostics*. Esta utiliza quatro reagentes e as suas ações sucessivas criam uma cor violeta nos leucócitos que é visível principalmente na cromatina, nas plaquetas e nos grânulos das células granulócitas.

## **VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO**

A velocidade de sedimentação (VS) é a medição da rapidez com que os eritrócitos sedimentam, durante uma hora. É uma medição da fase aguda de resposta a uma doença inflamatória.

Apesar de não ser um procedimento específico, esta análise é clinicamente útil uma vez que o valor pode ser influenciado pela concentração de algumas proteínas cuja concentração plasmática se modifica em situações inflamatórias, pela existência de algumas patologias, por propriedades dos eritrócitos e pelo grau de anemia (hematócrito). Valores elevados estão relacionados com qualquer tipo de infeção, mas também são característicos na presença de leucemias, linfomas e carcinomas [13].

Normalmente o valor da VS está entre 1 e 10mm por hora, em doentes do sexo masculino, e entre 1 e 15mm em doentes do sexo feminino. Em condições patológicas este valor pode aumentar substancialmente, muitas vezes até 100mm.

Esta análise é realizada no *Ves-Matic Cube 30* e está programada para 33 minutos, sendo o resultado obtido convertido para uma hora. O dispositivo determina

automaticamente o nível de sedimentação dos eritrócitos através do grupo ótico-eletrónico que possui, enquanto as amostras repousam.

Esta análise é efetuada sem consumo de amostra, utilização de reagentes e produção de resíduos. São usados os mesmos tubos com EDTA colhidos para o hemograma, pelo que não é necessária a colheita de mais um tubo.

## **CITOMETRIA DE FLUXO**

A citometria de fluxo é uma técnica que nos permite identificar diversas células humanas através dos seus antígenos de superfície. É realizada no *Cytomics FC 500* da *Beckman Coulter* e o seu funcionamento consiste na medição da luz dispersa e da fluorescência à medida que as células passam através do feixe de laser. São usados anticorpos monoclonais contra os antígenos de superfície específicos de cada célula pesquisada, conjugados com fluorocromos. Quando uma célula passa no feixe do laser, a luz deste é dispersa e excita os fluorocromos ligados aos anticorpos causando a sua fluorescência, ou seja a emissão de luz por parte deles [8].

Este aparelho pode medir em simultâneo a dispersão frontal (FS), a dispersão lateral (SS) e cinco fluorocromos. A FS corresponde à quantidade de luz que é dispersa entre ângulos estreitos relativamente ao eixo do feixe de laser e a sua quantidade é proporcional ao tamanho da célula que dispersou essa luz. Já a SS é denominada como a quantidade de luz que é dispersa a um ângulo de cerca de  $90^\circ$ , relativamente ao eixo do feixe, e é proporcional à granularidade e complexidade da célula. As células também emitem luz fluorescente em todos os ângulos uma vez que estão conjugadas com os fluorocromos, e a quantidade desta luz permite ao aparelho identificar os antígenos de superfície das células [8].

As amostras são colhidas com EDTA, em tubos iguais aos usados para o hemograma. Antes de serem colocadas no citómetro é realizado um controlo de qualidade, em que a amostra-controlo é sujeita exatamente ao mesmo processo das restantes amostras. Quando o resultado do controlo é obtido e se verifica que está em conformidade com os valores esperados, as amostras são colocadas no *PrepPlus 2* onde são pipetadas para os tubos próprios do citómetro, e passam pelo *TQprep* onde vai ocorrer a lise dos eritrócitos e das plaquetas, para não interferir com o resultado, seguindo no final para o citómetro. No SPC do Hospital de Guimarães são realizadas as populações linfocitárias e a determinação de HLA-B27.

### ➤ **Populações linfocitárias**

A determinação das populações linfocitárias é realizada pois permite distinguir os diferentes tipos de linfócitos (T helper, T citotóxico, B e NK), o que não é possível no hemograma nem na visualização do esfregaço sanguíneo. A citometria é realizada a partir da contagem de linfócitos obtida no hemograma.

Usualmente as populações são realizadas em doentes com imunodepressão para a monitorização da terapêutica e da quantidade de linfócitos, sendo exemplos a pesquisa de imunodeficiências (normalmente em crianças) e o acompanhamento e monitorização de doentes portadores de HIV. No caso dos doentes com HIV, sabe-se que os linfócitos são as células atingidas uma vez que é nestes que o vírus se aloja, o que faz com que percam as suas funções e sejam destruídos. Além disso a terapêutica anti-retroviral tem influência na medula óssea e pode provocar diminuição da produção de linfócitos, sendo necessária a monitorização para auxiliar no ajuste da terapêutica.

Os parâmetros mais importantes são o *Ratio CD4/CD8* onde se estuda a relação entre os linfócitos T helper (CD4) e os T citotóxicos (CD8), e a quantidade de linfócitos TCD4 presentes na amostra. Contudo também é analisada a presença e quantificação das restantes células, estando os respetivos antígenos de superfície enumerados na tabela 3.

<b>Antigénio</b>	<b>Célula correspondente</b>
CD45	Linfócitos totais
CD4	Linfócitos T helper
CD8	Linfócitos T citotóxicos
CD3	Linfócitos T
CD56	Linfócitos NK
CD19	Linfócitos B

Tabela 3 – Antígenos de superfície pesquisados

### ➤ **Determinação de HLA-B27**

No âmbito da Citometria de fluxo é também feita a determinação do antígeno HLA-B27 na superfície de linfócitos em sangue total e a deteção de uma possível reação cruzada com o antígeno HLA-B7. É realizada uma análise qualitativa do perfil de positividade do

antigénio HLA-B27 com base na sua intensidade de fluorescência. A mistura de anticorpos monoclonais HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE permite detectar a expressão do antigénio HLA-B27 e discriminar uma possível reacção cruzada com o HLA-B7. Além disso, é utilizado um controlo para detetar situações de ocorrência de ligações não específicas.

O MHC (Complexo Major de Histocompatibilidade) é um grupo de genes localizado no cromossoma 6 que estão envolvidos na regulação da resposta imune, principalmente através do reconhecimento e apresentação de antigénios e codificam proteínas fundamentais à sinalização das células. Estas proteínas são antigénios que estão presentes à superfície de diferentes tipos de células. Nos humanos, o correspondente do MHC é denominado de HLA (Antigénio Leucocitário Humano). Os antigénios HLA-B27 e HLA-B7 pertencem ao complexo HLA classe I, sendo codificados no locus HLA-B [14].

O fenómeno de reacção cruzada do antigénio HLA-B27 com o HLA-B7 pode ser diferenciado através dos seguintes anticorpos monoclonais: HLA-ABC-m3, que reconhece o antigénio HLA-B27 e pode apresentar reacção cruzada com o HLA-B7, e o BB7.1, que apenas reconhece o antigénio HLA-B7 e por isso não tem afinidade com o HLA-B27. Quando esta situação acontece considera-se que a amostra é duvidosa e é necessário realizar uma confirmação por PCR.

A presença do antigénio HLA-B27 é comum em doentes com doenças inflamatórias que afectam as articulações intervertebrais e sacroilíacas estando por isso fortemente associada com espondilite anquilosante, uma doença inflamatória crónica que afecta as articulações do esqueleto axial. A sua determinação é utilizada no diagnóstico desta doença, onde 90% dos doentes expressam o HLA-B27, comparativamente com os 7-8% de indivíduos normais que também possam expressar. Contudo, a sua expressão está igualmente relacionada com outras doenças reumáticas tais como a artrite reactiva (síndrome de Reiter), a artrite psoriática e a doença inflamatória intestinal.

Nas figuras seguintes estão representados os gráficos resultantes, de acordo com a presença ou ausência dos antigénios em causa.

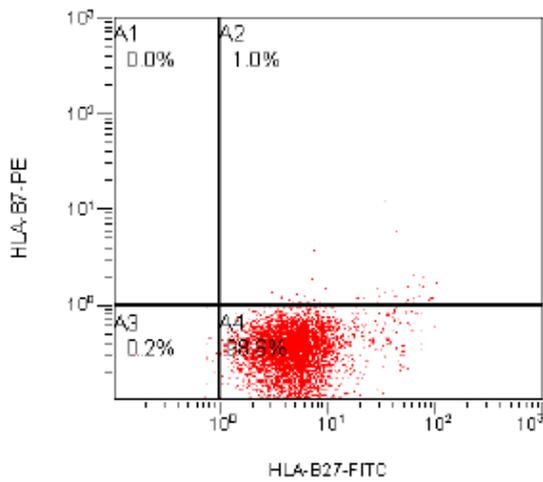


Figura 22 – HLA-B27+ / HLA-B7-

Fonte: SPC CHAA

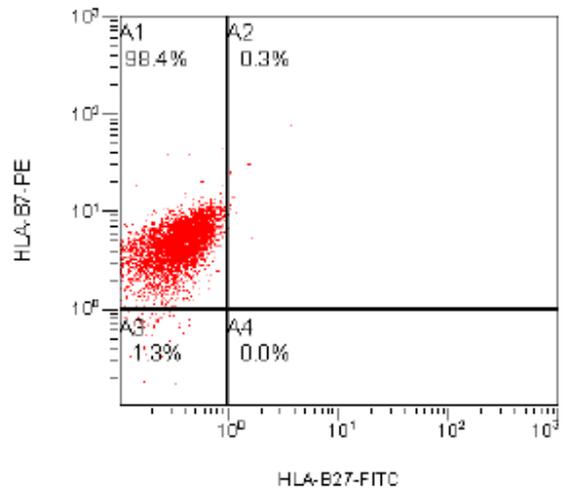


Figura 23 – HLA-B27- / HLA-B7+

Fonte: SPC CHAA

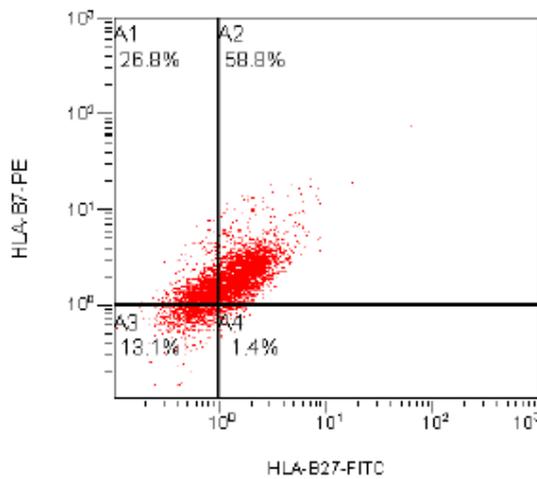


Figura 24 – HLA-B27+ / HLA-B7+ (duvidoso)

Fonte: SPC CHAA

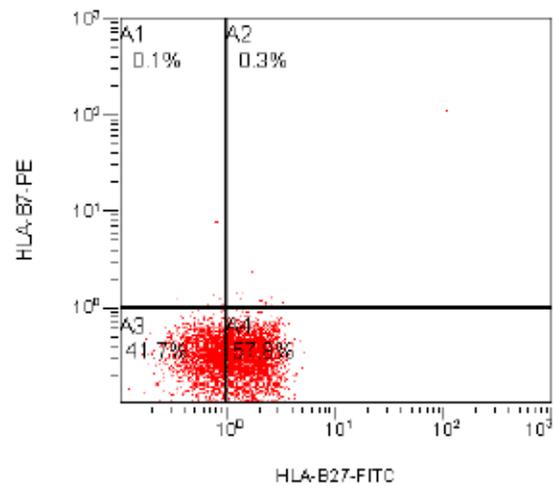


Figura 25 – HLA-B27 duvidoso / HLA-B7-

Fonte: SPC CHAA

## PESQUISA DE HEMOPARASITAS

A pesquisa de hemoparasitas é realizada preferencialmente no esfregaço sanguíneo, havendo contudo testes rápidos para auxiliar no diagnóstico. Existem varios parasitas que se alojam nas células sanguíneas, sendo um dos mais comuns o *Plasmodium spp*, pelo que no laboratório existe um teste para a pesquisa dos seus antígenos.

A malária é uma doença causada por um protozoário que parasita o sangue humano e é transmitida através da picada de um inseto infetado, entrando assim o parasita na corrente

sanguínea humana. Após completar o seu ciclo de vida, este invade os eritrócitos que perdem a sua forma e funções, pelo que a anemia é a consequência mais imediata desta doença. As espécies mais comuns são *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae* [15].

Para a pesquisa deste parasita é realizado o teste *Core™ Malaria Pan/Pv/Pf*, um ensaio imunocromatográfico rápido e qualitativo que deteta uma proteína específica do *Plasmodium falciparum* e do *Plasmodium vivax* e uma comum ao género, através da reação com anticorpos monoclonais contra estas. Este é usado para a deteção específica destas duas espécies (que são as mais prevalentes), para a diferenciação em relação a outras espécies e para monitorizar a terapêutica (através da tira *Pan*).

Este teste é útil e rápido pelo que permite iniciar o mais cedo possível a terapêutica antimalárica, no caso de um resultado positivo. Além disso, um resultado positivo deve ser sempre confirmado com a observação do respetivo esfregaço sanguíneo.

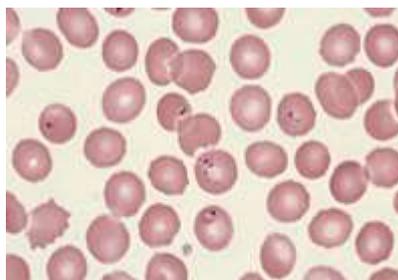


Figura 26 – *Plasmodium falciparum* a parasitar um eritrócito

Fonte: [2]

Para esta análise pode ser usado o sangue do tubo de EDTA utilizado para a realização do hemograma e deve ser executado de imediato. Amostras coaguladas ou contaminadas não devem ser usadas.

## COAGULAÇÃO

No Serviço de Sangue as amostras são colhidas para um tubo com o anticoagulante citrato trissódico, na proporção 1:9 de sangue. Estas são centrifugadas a 3500rpm durante 10 minutos para se obter plasma. As análises são feitas no *ACL TOP 700* e relacionam os diversos parâmetros da coagulação com o tempo que o coágulo demora a ser formado, em cada doente.

Os doentes que estão medicados com uma terapêutica anticoagulante são denominados de hipocoagulados, dado o seu risco de hemorragias, e deslocam-se periodicamente ao serviço para terem uma consulta e realizarem análises para monitorização desta terapêutica. À parte destes doentes, estas análises são realizadas normalmente como todas as outras sempre que houver pedido do médico.

Diariamente realizam-se os seguintes testes: Tempo de protrombina, Tempo de tromboplastina parcial ativado, Quantificação de fibrinogénio e Quantificação de D-dímeros. Uma vez por semana realizam-se os testes de trombofilia, que contemplam a Quantificação de antitrombina e do fator VIII e as Determinações das proteínas C e S e do anticoagulante lúpico.

## **MICROBIOLOGIA**

A área de microbiologia tem como função o isolamento e identificação de microrganismos que podem provocar doenças no Homem.

O laboratório de microbiologia do SPC do CHAA compreende o laboratório principal, onde são realizados todos os procedimentos quotidianos, a sala de micobactérias, que está isolada uma vez que requer mais segurança e cuidado na manipulação das amostras, e a sala de Biologia molecular. São recebidos vários tipos de amostras, nomeadamente amostras de sangue, catéteres, expetorações e secreções brônquicas, lavados e aspirados brônquicos, urinas, líquidos biológicos, fezes, exsudados purulentos e exsudados vaginais. Estas são colhidas, transportadas, processadas e armazenadas de forma específica e concordante com as necessidades dos microrganismos que se suspeita possuir e de acordo com os protocolos estabelecidos pelo laboratório, descritos no Manual de Colheitas. Todos os produtos são manipulados nas câmaras de fluxo laminar de modo a garantir a segurança dos técnicos, sendo esta uma preocupação constante.

São realizadas análises bacteriológicas, micobacteriológicas, parasitológicas, micológicas e virais, mas os procedimentos mais comuns de rotina incluem o exame direto (colorações), a sementeira nos meios de cultura, os testes imunocromatográficos, a identificação no *Vitek2* e os antibiogramas.

No exame direto, as colorações de Gram e Auramina são realizadas no aparelho de coloração automático *PolyStainer IUL*, enquanto que a de Ziehl-Neelsen ainda é realizada de forma manual. Os protocolos destas encontram-se em anexo.

Todas as placas de petri devidamente semeadas são incubadas a 37°C durante 18 a 24 horas na estufa, excepto as que foram semeadas a partir de líquidos biológicos (pleural e ascítico) e LCR, cujo tempo de incubação é de 48 e 72 horas respetivamente (dadas as suas características estéreis). Contudo, se não houver crescimento volta-se a incubar mais 24 horas. Quando há suspeita de microrganismos fastidiosos, como *Neisseria spp* e *Gardnerella vaginalis*, é usual deixar as placas a incubar durante 3 a 5 dias. Os meios de sangue e de chocolate são incubados em estufa com 5% de dióxido de carbono, enquanto todos os outros incubam em estufa sem este gás. No caso da pesquisa de fungos as placas são incubadas a 25°C e por períodos mais prolongados.

## MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

- **Gelose de sangue:** É um meio enriquecido e não-selectivo pois permite o crescimento de uma grande variedade de microrganismos. Além disso permite o crescimento de microrganismos fastidiosos [16]. Contudo pode ser considerado também um meio diferencial uma vez que faz a distinção entre microrganismos consoante a sua hemólise ( $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ ) [17]. A hemólise acontece porque certas bactérias produzem enzimas extracelulares que lisam os eritrócitos do meio, e podem apresentar três aspetos diferentes consoante o tipo de hemólise ( $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ ). Na  $\beta$ -hemólise ocorre o desaparecimento de todos os eritrócitos em redor da colónia da bactéria, enquanto que na  $\alpha$ -hemólise apenas ocorre lise de algumas células, produzindo um halo esverdeado à volta da colónia. Já na  $\gamma$ -hemólise esta não existe, ou seja, os eritócitos não são lisados por isso não se forma qualquer halo à volta da colónia [16].



Figura 27 –  $\beta$ - hemólise  
Fonte: SPC CHAA



Figura 28 –  $\alpha$ - hemólise  
Fonte: SPC CHAA

- **Gelose de chocolate:** A gelose de chocolate + PolyViteX, ou gelose PVX, é semelhante à gelose de sangue mas contém os eritrócitos já lisados, ficando o meio com a cor castanha. Esta lise liberta nutrientes intracelulares, como os fatores de coagulação X (heme) e V (NAD) para poderem ser utilizados pelos microrganismos. É usada preferencialmente para a pesquisa de estirpes fastidiosas como *Haemophilus spp* (uma vez que não crescem em gelose de sangue já que necessitam dos fatores de coagulação), *Neisseria spp* e *Streptococcus pneumoniae* [16].

- **Gelose MacConkey:** É usada para o isolamento e diferenciação de bacilos Gram-negativos entéricos fermentadores e não-fermentadores de lactose. É constituída por lactose, vermelho neutro como indicador de pH e cristal violeta e sais biliares como inibidores de bactérias Gram-positivas. O indicador de pH distingue os fermentadores de lactose dos não-fermentadores uma vez que a fermentação de lactose resulta na produção de ácido e leva à diminuição do pH, ficando as colónias das bactérias fermentadoras (ex: *E. coli*) com uma cor rosa-avermelhada. Por outro lado, as que não são fermentadoras desta (ex: *Shigella spp*) continuam incolores, uma vez que não há alteração de pH [16].

- **Gelose de manitol:** Também conhecida como gelose de Chapman, é um meio seletivo e diferencial que só permite o crescimento de *Staphylococcus spp*. Possui manitol e vermelho de fenol como indicador, além de uma concentração de cloreto de sódio de 7,5% que inibe o crescimento de muitas bactérias excepto *Staphylococcus spp* uma vez que são halotolerantes [16]. A identificação de *S. aureus* é visualizada através da fermentação do manitol por parte deste, ocorrendo produção de ácido e mudança de cor do meio, apresentando-se as

colónias características deste amarelas, o que as distingue das outras espécies de estafilococos [18].

- **Gelose SS:** É um meio de isolamento seletivo e diferencial de *Salmonella spp* e *Shigella spp*, constituído por lactose, citrato de ferro e citrato de sódio. Este meio distingue estas duas espécies das restantes Gram-negativas que podem eventualmente crescer, devido ao indicador vermelho neutro que muda a cor das colónias das estirpes fermentadoras de lactose de incolor para rosa. A presença de sais de ferro permite detetar as estirpes que possuem a enzima tiosulfato redutase, ou seja, que reduzem o tiosulfato e produzem H<sub>2</sub>S, havendo a formação de um centro negro. As colónias de *Salmonella spp* são incolores com ou sem centro negro, enquanto que as de *Shigella spp* também se apresentam incolores mas sem centro negro. Ambas são incolores já que estas bactérias não fermentam a lactose. Além disso o meio possui uma mistura de sais biliares e corantes que inibem as bactérias Gram positivo [16;19].

- **Gelose SMAC:** É usada para o isolamento de *Escherichia coli*, mas com a diferenciação do serótipo O157:H7. Este meio tem as mesmas características que o meio de MacConkey mas também possui sorbitol, que permite que as colónias desta estirpe se apresentem incolores com centro acastanhado uma vez que não fermentam este açúcar. As fermentadoras apresentam-se cor de rosa. Além disso o meio possui cefixima, sais biliares e cristal violeta para inibir Gram-positivas e algumas enterobactérias.

- **Gelose YER/CIN:** É utilizada para o crescimento único de *Yersinia spp*, sendo que a espécie *Yersinia enterocolitica* é a que se pesquisa por causar infeções no trato gastrointestinal. O meio é composto pelos antibióticos cefsulodina, irgasan e novobiocina, e por desoxicolato e cristal violeta que inibem seletivamente o crescimento de todas as outras bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. É também constituído por manitol e vermelho neutro para diferenciar a *Yersinia enterocolitica*, uma vez que fermenta o manitol do meio e produz pH ácido, sendo as suas colónias características vermelhas no centro com um halo incolor [20].

- **Gelose STRB:** É usada para o isolamento seletivo de estreptococos do grupo B, ou seja, *Streptococcus agalactiae*. É um meio seletivo e cromogénio que combina três substratos cromogénios e antibióticos. As colónias deste estreptococo de interesse apresentam-se rosa

avermelhadas, sendo que as restantes ou não crescem ou não apresentam colónias características.

- **Gelose GAR:** É um meio de isolamento seletivo que apenas permite o crescimento de *Gardnerella vaginalis* em amostras genitais e tem presente sangue humano na sua constituição. Esta bactéria produz  $\beta$ -hemólise à volta das suas colónias, sendo esta uma característica que a distingue e identifica de forma presuntiva neste meio (é necessário proceder à identificação no Vitek2). Além disso, possui antibióticos que inibem grande parte das Gram-negativas e leveduras do trato genital.

- **Gelose de chocolate VCAT:** Esta isola apenas *Neisseria meningitidis* e *Neisseria gonorrhoeae*, contudo no contexto vaginal apenas a última tem interesse. Este não é mais que uma gelose de chocolate com a adição de quatro antibióticos: vancomicina, colistina, anfotericina e trimetoprim, que inibem o crescimento das restantes bactérias e de fungos da flora genital mas permitem o da *N. gonorrhoeae* [18].

- **Gelose SGC:** É um meio seletivo de leveduras e bolores a partir de amostras polimicrobianas, como é o caso das vaginais. Esta gelose contém os antibióticos gentamicina e cloranfenicol na sua constituição, assim como um pH ácido, numa tentativa de inibir grande parte do crescimento bacteriano.

- **Gelose CLED:** É um meio cromogénio, geralmente utilizado para cultura de amostras de urina uma vez que permite o isolamento dos agentes mais frequentes de infeção urinária. Contém cistina e lactose (que diferencia os fermentadores dos não-fermentadores) e é deficiente em eletrólitos, característica que lhe permite inibir o *swarming* de *Proteus spp.* As bactérias que fermentam a lactose produzem colónias amarelas, devido à acidificação do meio, enquanto que as não-fermentadoras se apresentam verdes, azuis ou incolores [18;21].

- **Gelose Cocol:** É composta por bÍlis, esculina e azida sódica e é usado para o isolamento seletivo e diferenciação de enterococos e estreptococos do grupo D. As colónias destas bactérias apresentam-se incolores ou acinzentadas e rodeadas por um halo negro, resultado da hidrólise de esculina. A bÍlis inibe várias bactérias Gram-positivas enquanto a azida sódica inibe o crescimento das Gram-negativas.

- **Caldo GN:** É um meio líquido de enriquecimento para enterobactérias, principalmente para *Salmonella spp* e *Shigella spp*. É constituído manitol, que promove seletivamente o crescimento das bactérias já referidas, e contém ingredientes que inibem o crescimento da flora normal gastrointestinal, tal como citrato de sódio e desoxicolato de sódio (sal biliar) [16;18].

- **Meio de Lowenstein Jensen:** É um meio à base de ovo que contém verde de malaquite como agente inibidor de bactérias de Gram positivo e de Gram negativo, ou seja, da flora normal. As micobactérias apresentam-se neste meio com aspeto semelhante a couve-flor, tal como mostra a figura 29 [22].



Figura 29 – *Mycobacterium tuberculosis* em meio de Lowenstein Jensen  
Fonte: SPC CHAA

## AMOSTRAS

### ➤ Sangue

O sangue é um líquido estéril e por essa razão o crescimento de qualquer tipo de bactéria é imediatamente indicativo de infeção (quando a colheita é efetuada corretamente) e por norma está associada a quadros clínicos graves.

As amostras de sangue são colhidas para garrafas próprias, nos doentes internados ou das urgências com sintomas febris graves, através de punção venosa. Normalmente uma amostra de sangue é colhida para duas garrafas com os meios de cultura apropriados, uma aeróbia e uma anaeróbia, denominando-se hemocultura. Após a colheita da amostra de sangue transfere-se este para as garrafas, começando pelo frasco anaeróbio, num volume máximo de 10ml por frasco nos adultos e 4ml nas crianças. Para distinguir as garrafas usam-se tampas de diferentes cores: verde para as aeróbias, laranja para as anaeróbias e amarela para as que possuem amostras pediátricas.

Quando chegam ao laboratório, as amostras são então colocadas no *BacT/ALERT*<sup>®</sup>, um aparelho específico para hemoculturas, onde ficam a incubar durante cinco dias após a colheita ou até este detetar um resultado positivo. É totalmente automatizado e permite incubar, agitar e monitorizar continuamente os meios inoculados com produtos de doentes suspeitos de bacteriémia, fungémia e/ou micobacteriémia. Utiliza um sensor colorimétrico e a reflexão da luz para monitorizar a existência e produção de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) dissolvido no meio. Esta produção de CO<sub>2</sub> é resultado do metabolismo dos substratos do meio de cultura, pelos microrganismos que possam existir. Como o sensor é permeável ao gás a cor muda para amarelo ou verde claro, devido à modificação das unidades de refletância monitorizadas pelo sistema.

Se o aparelho não detetar qualquer tipo de crescimento, a amostra é dada como negativa; se detetar crescimento este pode indicar infeção ou possível contaminação (ocorrida durante a colheita). Assim as amostras positivas são semeadas em gelose de chocolate através de uma seringa, com a colocação de uma gota na placa seguida de cultura por espalhamento em três quadrantes. Nas amostras positivas provenientes da UCIP (Unidade de Cuidados Intensivos Polivalentes), UCIC (Unidade de Cuidados Intensivos Cardíacos) e da Pediatria é também feita uma coloração de Gram, com o intuito de indicar mais rapidamente se é infeção ou contaminação.

Como já foi referido, é necessário perceber se o crescimento se deve a contaminação ou infeção. Se estivermos perante um caso de contaminação, esta deve-se a uma situação de má colheita e, por isso, irão crescer bactérias que colonizam a pele tal como estafilococos coagulase negativa. Se na placa crescerem bactérias que não são comensais da pele, como por exemplo enterobactérias, os restantes bacilos Gram negativos, estreptococos e *Staphylococcus aureus*, será mais provável uma causa de infeção. Esta apreciação é sempre realizada no contexto clínico pelo patologista responsável.

Quando temos uma hemocultura anaeróbia com suspeita de microrganismos anaeróbios é necessário criar uma atmosfera de incubação adequada na repicagem para permitir o crescimento destas bactérias. Para isso usa-se as Bolsas de criação de gás *GasPak EZ*, que contêm um reagente que é ativado quando é aberto e exposto ao ar. Este é colocado juntamente com a placa de petri na bolsa, que vai ser fechada para o reagente eliminar o oxigénio existente (no período de 2h30) e produzir 10% ou mais de dióxido de carbono (em 24h).

Quando é pedida a pesquisa de fungos, as garrafas ficam a incubar no *BacT/ALERT*<sup>®</sup> durante 15 dias, uma vez que estes microrganismos têm um crescimento mais lento que as bactérias.

### ➤ **Catéteres**

Uma amostra de um catéter é colhida para a pesquisa de infeções em pacientes internados, nos locais onde estão colocados os catéteres. Deste modo é recolhida a ponta do catéter, após desinfeção da pele em redor, colocada num frasco estéril e transportada de seguida para o laboratório.

O catéter é semeado em gelose de sangue mas com um método diferente, em que se faz o rolamento da ponta do catéter ao longo da placa de petri, aproximadamente cinco vezes. Este método permite fazer a contagem de colónias que cresceram no meio e, como é suposto ser estéril, a partir de 15 colónias já se considera uma amostra com significado clínico, se correlacionada com o resultado da hemocultura.

### ➤ **Expetoração e secreções brônquicas**

A recepção de amostras do trato respiratório inferior é muito frequente a partir de doentes com infeções neste local e as amostras mais colhidas são as expetorações, geralmente em idosos em imunodeprimidos, e as secreções brônquicas (colhidas por broncoscopia) para a monitorização de doentes da UCIP.

As expetorações são associadas a doentes com pneumonias adquiridas na comunidade ou hospitalares e com suspeita de tuberculose. As amostras destas são colhidas para um frasco estéril de preferência de manhã, que é quando a amostra é mais representativa e com menos interferências, uma vez que durante a noite houve acumulação das secreções no trato respiratório. Tem que haver sempre o cuidado de verificar se é realmente expetoração e não saliva através da contagem de células epiteliais no Gram, uma vez que o exame cultural bacteriano não é realizado em amostras de saliva.

No caso do exame bacteriológico, quando esta amostra é recebida no laboratório o procedimento padrão passa por fazer uma coloração de Gram para triagem. A inoculação nos meios de cultura é pedida após observação ao microscópio da Coloração de Gram,

quando se visualizam menos de 10 células epiteliais por campo, na objetiva de 10×. Isto acontece porque uma amostra com mais células epiteliais já é considerada saliva, o que a torna imprópria para cultura. Caso sejam observados mais de 25 leucócitos por campo é uma indicação de que há infecção. Quando cumpre estes requisitos, a amostra é inoculada nas geloses de sangue, de chocolate, de MacConkey e de manitol para permitir o crescimento das bactérias existentes de modo a serem identificadas e comparadas com o que foi visualizado no Gram.

No caso de amostras de doentes da UCIP, estas são diretamente semeadas nos quatro meios de cultura já referidos, com contagem de colónias, independentemente da hora a que são recebidas no laboratório.

As bactérias mais comuns e importantes numa amostra de expetoração são, no caso de pneumonia da comunidade, *S. pneumoniae* e *H. influenzae* e no caso das hospitalares, *S. aureus* e bacilos Gram negativo (enterobactérias e *Pseudomonas spp*).

Normalmente quando se faz a colheita desta amostra e há suspeita de tuberculose, é solicitada a pesquisa de micobactérias. Para isso, é realizada uma descontaminação da amostra e uma coloração de Auramina. Quando a coloração de Auramina dá um resultado positivo ou duvidoso é realizada uma coloração de Ziehl-Neelsen para confirmação.

A coloração de Auramina (também chamada de Auramina-Rodamina) envolve fluorescência, devido ao facto de os ácidos micólicos constituintes da parede das micobactérias possuírem afinidade para os fluorocromos Auramina e Rodamina. Deste modo, estes ligam-se sem especificidade junto das micobactérias presentes, que se apresentam com uma cor laranja ou amarela brilhante, visualizado num microscópio de fluorescência [22].

Na coloração de Ziehl-Neelsen para a aplicação do primeiro corante (a fucsina de Ziehl) é necessário fornecer calor uma vez que só assim o corante consegue atravessar a parede celular, ficando as bactérias com a cor vermelha. De seguida aplica-se a solução de Gabett que combina o descorante (HCl em etanol) e o segundo corante (azul de metileno). Depois da aplicação do descorante apenas as micobactérias mantêm esta cor pois são as únicas que lhe resistem e não coram com a aplicação do segundo corante. As restantes bactérias existentes perdem a cor vermelha com o descorante e tornam-se azuis com a aplicação do azul de metileno, permitindo-nos assim fazer a distinção entre elas e as micobactérias [22].

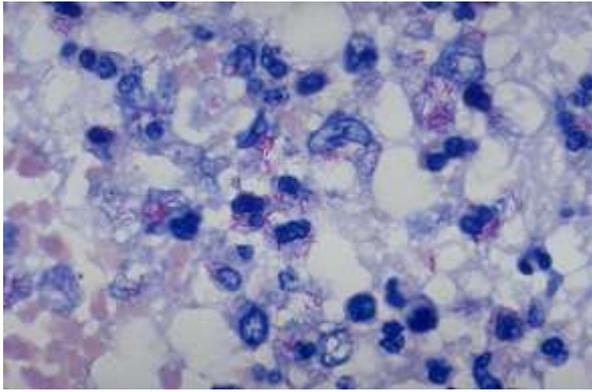


Figura 30 – *M. tuberculosis* em coloração de Ziehl-Neelsen  
Fonte: [23]

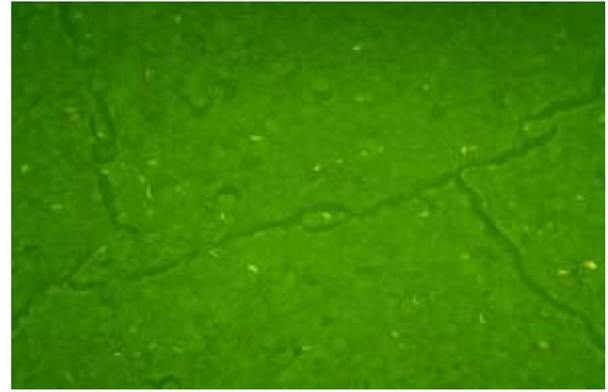


Figura 31 – *M. tuberculosis* em coloração de Auramina  
Fonte: [24]

Quanto à descontaminação, esta é realizada com o objetivo de eliminar outras bactérias que possam estar presentes e que, por crescerem mais rapidamente, possam impedir ou camuflar o crescimento das micobactérias [25]. Assim, a amostra é misturada com um reagente que possui hidróxido de sódio para matar todas as bactérias e N-acetilcisteína que a torna mais liquefeita. Após centrifugação (15 minutos a 3500rpm) decanta-se até restar só o sedimento, ao qual é adicionado tampão fosfato para acertar o pH a  $\approx 7$ . Semeia-se em meio de Lowenstein Jensen e em meio líquido, ficando a incubar durante aproximadamente 60 dias e 42 dias, respetivamente, uma vez que o crescimento das micobactérias é bastante lento.

O meio líquido está presente em garrafas próprias para micobactérias, semelhante às utilizadas nas hemoculturas, e permitem um crescimento mais rápido do que o meio de Lowenstein Jensen. Este meio líquido é constituído por caldo de Middlebrook com caseína, catalase e albumina de soro bovino. A estas garrafas é adicionada uma mistura que combina um suplemento de antibiótico com um fluido de reconstituição, que permite reduzir a contaminação por outros microrganismos (que resistiram à descontaminação) e assegurar um crescimento ótimo das micobactérias presentes na amostra. As garrafas são incubadas no BacT/ALERT<sup>®</sup>, programado só para detetar micobactérias, mas com o mesmo procedimento das hemoculturas.

Quando a amostra dá positiva é realizada uma coloração de Ziehl-Neelsen, e se esta também for positiva, é realizado um PCR para confirmar a existência de micobactérias na amostra. Se o PCR for positivo é enviada a cultura para um laboratório de referência para se realizarem os testes de suscetibilidade.

Contudo, a detecção de micobactérias não é fácil e, por essa razão, são colhidas várias amostras de expectoração porque estas podem não crescer ou não estar presentes na primeira amostra. Além disso é frequente serem enviadas amostras de saliva em doentes que não conseguem expetorar. Como alternativa pode ser colhida uma amostra de suco gástrico, já que os pacientes engolem a expetoração em vez de a expulsar.

Por vezes pode ser pedida a pesquisa de *Legionella pneumophila* em secreções brônquicas e/ou em expectorações. Esta pesquisa só se realiza uma vez por semana e é através de imunofluorescência direta, onde é feita a pesquisa de antígenos desta bactéria. Com a adição de um reagente que contém anticorpos conjugados com um fluoróforo (isotiocianato de fluoresceína) e específicos da *L. pneumophila* consegue-se detetar todos os serogrupos da bactéria. As lâminas são visualizadas num microscópio de fluorescência, ou seja, os antígenos presentes vão emitir fluorescência devido ao fluoróforo [26].

### ➤ **Lavados e aspirados brônquicos**

Quando uma amostra de um lavado ou aspirado brônquico é recebida no laboratório é centrifugada, de modo a torná-la mais concentrada. A partir do sedimento faz-se uma coloração de Gram e a sementeira nos meios de cultura MacConkey, de sangue, de chocolate e manitol.

Quando é pedida a pesquisa de micobactérias também se faz uma lâmina para a coloração de Auramina e a cultura em Lowenstein Jensen, seguindo-se os passos já descritos para as expetorações.

### ➤ **Urina**

A urina é a amostra mais frequente neste serviço de Patologia Clínica porque, além de ser uma análise de rotina, está intrinsecamente ligada às infeções urinárias muito frequentes no ser humano. É recolhida a primeira urina da manhã para um recipiente estéril, sendo necessário rejeitar sempre o primeiro jacto para evitar arrastar células epiteliais e microrganismos colonizadores do trato urogenital. Geralmente, e em situações normais, é este método de colheita do jato médio que é realizado, contudo pode ser feita uma punção

de catéter urinário em doentes algaliados, uma punção supra-púbica ou a recolha para sacos coletores em crianças e bebés [18].

O exame bacteriológico é realizado no sector de microbiologia e é complementado com o resultado da Urina Tipo II, realizado na bioquímica.

Para a urocultura realiza-se uma sementeira para uma placa de petri com meio de cultura CLED e de modo a ser possível a contagem de colónias.

A contagem é então feita e o crescimento de colónias de bactérias superiores a  $10^6$  é sempre valorizável e indicativo de infeção. Contudo outras contagens inferiores podem também ser valorizadas conforme o tipo de colheita e a flora bacteriana que crescer na placa. Nesta valorização é necessário ver o diagnóstico clínico, os sintomas e o sedimento urinário do paciente (para verificar a presença de leucócitos). Procede-se à repicagem das amostras valorizadas para outros meios de cultura apropriados conforme o crescimento visualizado (normalmente MacConkey para o crescimento de enterobactérias), à identificação no Vitek2 e à realização do antibiograma.

Contudo, nem sempre a urina é transportada para o laboratório nos frascos estéreis acima mencionados. Em muitos casos de pacientes internados, da urgência ou da pediatria, após a colheita para o frasco, a urina é logo transferida no local para o Uriline, como forma de ultrapassar a barreira de receção de urinas nos turnos de urgência.

Este consiste num tubo que contém três pequenos compartimentos com meios de cultura, sendo que, quando este chega ao laboratório, é imediatamente colocado na incubadora uma vez que já está semeado. Os meios de cultura são então o CLED, MacConkey e Cocosel que permitem, respetivamente, fazer a contagem dos microrganismos urinários, o crescimento seletivo das enterobactérias e a deteção de enterococos.

Pode também ser pedida a pesquisa de micobactérias na urina e, para isso, é necessário descontaminá-la primeiro, pelo procedimento enunciado nas expetorações. A partir do sedimento formado colocamos uma gota numa lâmina para a coloração de Auramina e uma porção para um tubo estéril para posteriormente cultivarmos em Lowenstein Jensen, realizando o procedimento já descrito com as expetorações.

Um outro teste que é frequentemente pedido é a pesquisa de *L. pneumophila* e de *S. pneumoniae* na urina através de testes rápidos imunocromatográficos.

## ➤ Líquidos biológicos

Os líquidos são amostras que não chegam com tanta frequência ao laboratório, uma vez que uma infecção nestes não é tão comum já que são estéreis. Temos como amostras mais frequentes os líquidos pleural, ascítico e cefalorraquídeo (LCR).

O procedimento para o exame bacteriológico destas amostras é a coloração de Gram e a sementeira em gelose de sangue e chocolate. Esta é realizada pelo método de gota e picada em tres posições distintas do meio, uma vez que o crescimento de microrganismos nestes líquidos é normalmente baixo, dada a sua esterilidade em situações normais. Assim a picada permite-nos saber onde semeamos o líquido e a gota é colocada para concentrar a amostra naquele local, pois se semeassemos no meio todo o líquido ficaria mais diluído e o crescimento seria mais diperso e de difícil visualização.

Todo o crescimento é valorizável uma vez que geralmente não ocorre contaminação durante a colheita. No LCR o mais frequente é a pesquisa de *S. pneumoniae* e *N. meningitidis* enquanto que nos outros líquidos pode ocorrer o crescimento de todas as bactérias.

Quando é pedida a pesquisa de micobactérias também se faz a coloração de Auramina e a cultura no meio de Lowenstein Jensen. É importante referir que o exame direto pela coloração de Auramina tem que ser confirmado com Ziehl-Neelsen e pelo crescimento nos meios líquido e/ou sólido.

Além disso também é realizada a pesquisa de *S. pneumoniae* e, com menos frequência, de *Cryptococcus spp* no LCR por testes imunocromatográficos.

## ➤ Fezes

A pesquisa de microrganismos nas fezes faz-se quando há suspeita de alguma infecção no trato gastrointestinal. As amostras mais frequentes são de crianças com sintomas diarreicos, para pesquisa de microrganismos causadores desta. Estas infecções podem ser causadas por muitas bactérias, por toxinas bacterianas, por parasitas e ainda por vírus.

Estas amostras podem ser colhidas uma única vez ou em três dias consecutivos para um frasco estéril, dependendo do microrganismo suspeito. A colheita em três dias, de preferência alternados, é mais comum na pesquisa de parasitas uma vez que a emissão destes nas fezes não é contínua.

Quanto ao exame bacteriológico está definido fazer-se uma coloração de Gram e semear em geloses de sangue, SS, SMAC, e YER/CIN e num caldo de enriquecimento GN. Após 24 horas de incubação, a partir do caldo GN semeia-se novamente em gelose SS. Além destes, caso haja pedido médico específico para pesquisa de *Campylobacter jejuni*, usa-se o meio de cultura Campyloset.

O exame parasitológico inclui um exame macroscópico e um microscópico. No primeiro analisa-se a cor e consistência das fezes e verifica-se se há presença de muco e/ou sangue e parasitas. Quanto ao exame microscópico é preparado através do IBERKIT Easy-Copros e é baseado no método de sedimentação por centrifugação de Ritchie, com o objetivo de concentrar ovos e quistos de parasitas intestinais num volume mais pequeno, eliminando também a maioria dos resíduos fecais que contaminam a amostra. O sedimento é observado a fresco entre lâmina e lamela no microscópio óptico, na objetiva de 10× e é necessário observar toda a lâmina. Além disso observa-se na objetiva de 40× para pesquisar a presença de parasitas de menor tamanho, como por exemplo a *Giardia lamblia*.

Relativamente aos vírus, o laboratório possui testes rápidos baseados em ensaios imunocromatográficos com a pesquisa de antígenos, para a deteção de vírus causadores de diarreia: Norovírus, Rotavírus, Astrovírus e Adenovírus.

Além dos vírus, fazem-se estes testes rápidos para a pesquisa de *Giardia lamblia*, de *Entamoeba histolytica*, de *Cryptosporidium spp*, de Shiga toxina e do antígeno e das toxinas A e B de *Clostridium difficile*. Apesar de serem análises relacionadas com a bioquímica, a pesquisa de sangue oculto e de elastase fecal e a quantificação de calprotectina são realizadas neste setor também por testes imunocromatográficos.

### ➤ **Exsudado purulento**

As amostras de pús podem ter origem em feridas à superfície da pele ou em abscessos e drenos. As amostras de feridas superficiais são colhidas através da raspagem com zaragatoa e transportadas para o laboratório em meio de transporte de Stuart, enquanto que as amostras mais profundas são colhidas por aspiração ou drenagem para um frasco estéril. O meio de Stuart é usado para manter intactos os microrganismos existentes na amostra, até um período de 24 horas [18].

O procedimento padrão estabelecido pelo laboratório para estas amostras é a coloração de Gram e sementeira em gelose de sangue, de chocolate, de manitol e MacConkey. Os microrganismos mais comuns nas amostras são estafilococos (*S. aureus*), estreptococos (*Streptococcus pyogenes*) e bacilos Gram negativo. Contudo, estes dependem do tipo e do local de infeção pelo que é necessário conhecer a flora normal dessa zona para saber interpretar se o crescimento é valorizável ou não (contaminação).

### ➤ **Exsudado vaginal**

As amostras vaginais são colhidas pelos ginecologistas ou obstretas, tanto no internamento como nas consultas externas, com uma zaragatoa que é transportada num meio de transporte de Stuart, tal como os pús, até ao laboratório. Podem ser pedidas dois tipos de análises: o exame bacteriológico vaginal ou só a pesquisa de estreptococos do grupo B.

Quando é pedido o exame bacteriológico é feita uma coloração de Gram e a sementeira para os meios de sangue, chocolate, STRB, GAR, chocolate VCAT, SGC (apesar de ser para crescimento fúngico) e é feita uma galeria de identificação IST2.

Os microrganismos mais frequentes neste tipo de infeções são *S. agalactiae* e *Candida albicans*.

A galeria de identificação IST2 é usada para o diagnóstico dos micoplasmas urogenitais, e permite a cultura, identificação, contagem e determinação da sensibilidade aos antibióticos de *Mycoplasma hominis* e *Ureoplasma spp*. Esta contém 22 testes associados a um caldo com as condições necessárias ao crescimento dos micoplasmas, substratos específicos e vermelho de fenol como indicador de pH. Além disso, como a amostra pode estar contaminada com outras espécies, o caldo contém três antibióticos e um antifúngico para inibir o seu crescimento. Estas bactérias são normalmente pesquisadas em mulheres grávidas no início da gravidez pois podem causar interrupção desta durante este período.

Nos casos em que só é pedida a pesquisa de estreptococos do grupo B apenas se faz a sementeira em geloses de sangue e STRB, uma vez que estas permitem o crescimento e identificação preliminar destas bactérias. Na gelose de sangue elas conseguem provocar  $\alpha$ -hemólise que as caracteriza e leva à suspeita do seu crescimento. Este pedido é frequente em mulheres grávidas, normalmente três vezes durante a gestação (uma vez em cada trimestre). Isto deve-se ao facto de estas mulheres poderem estar colonizadas com estas

bactérias e, se assim for, durante o parto podem transmitir ao bebê, sendo prejudicial para este uma vez que pode causar sepsis.

## TESTES DE IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Após a incubação e quando se deteta a presença de microrganismos nos respectivos meios de cultura, o patologista responsável decide quais as placas que têm que voltar a ser incubados, quais as que seguem para o autoanalisador *Vitek2* e a partir das quais é necessário fazer testes bioquímicos e de identificação.

O *Vitek2* é um aparelho que nos identifica a espécie presente numa amostra e nos realiza o respectivo antibiograma. Para isso são colocadas cartas de identificação e de antibiogramas, com base no género que se suspeita existir na amostra mediante o que foi visualizado nos meios de cultura, e que estão enumeradas na tabela 4.

Denominação	Código
Identificação Gram negativos	GN
Identificação Gram positivos	GP
Identificação fungos leveduriformes	YST
Identificação <i>Neisseria spp</i> e <i>Haemophilus spp</i>	NH
Identificação anaeróbios	ANC
Antibiograma Enterobactérias	AST-NI92
Antibiograma Enterobactérias - Urina	AST-N244
Antibiograma <i>Pseudomonas ssp</i> e <i>Acinetobacter spp</i>	AST-N222
Antibiograma Estafilococos	AST-P619
Antibiograma Estreptococos grupo B e Enterococos	AST-P586
Antibiograma <i>Streptococos viridans</i> , <i>S. pneumoniae</i> e estreptococos $\beta$ -hemolíticos	AST-ST01

Tabela 4 – Cartas usadas no *Vitek2*

Contudo há certos testes bioquímicos manuais que podem ser feitos, uma vez que não é necessário recorrer sempre ao *Vitek2*, ou então que podem ajudar a decidir quais as cartas de identificação que temos que usar neste.

- **Teste da Catalase:** Este teste é usado para identificar bactérias Gram-positivas e principalmente para distinguir *Staphylococcus spp* (catalase positiva) de *Streptococcus spp* (catalase negativa). Deste modo, retiramos uma colónia isolada para uma lâmina e adicionamos peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ); se a enzima catalase estiver presente é rapidamente feita a separação entre a água ( $H_2O$ ) e o oxigénio ( $O_2$ ), com consequente libertação de bolhas efervescentes ( $O_2$ ). A colónia de bactérias não deve ser proveniente de gelose de sangue uma vez que pode dar um resultado falso-positivo, porque os eritrócitos presentes ao reagir com o peróxido de hidrogénio também podem libertar bolhas de oxigénio, embora em menor quantidade [27].

- **Teste da Coagulase/PROLEX™ STAPH LATEX KIT:** Este teste permite-nos diferenciar *S. aureus* (coagulase positiva) das restantes espécies de *Staphylococcus spp* (coagulase negativa). Este produz duas formas de coagulase: a coagulase ligada e a livre, mas neste laboratório só se pesquisa a forma ligada. São utilizadas partículas de latex com azul de poliestireno, previamente sensibilizadas com fibrinogénio e IgG, que são então adicionadas à colónia de estafilococos da amostra em análise. Se esta possuir a enzima coagulase, esta age sobre o fibrinogénio e ocorre aglutinação [27].

- **Teste da Oxidase:** Com este pretende-se determinar a presença da enzima citocromo oxidase através da sua reação com o substrato dicloreto de tetrametil-*p*-fenilenodiamina. É então colocada uma porção de substrato num pedaço de papel de filtro e adicionamos uma colónia da bactéria em análise. Se a bactéria possuir a enzima, reage com o substrato e o papel fica com a cor roxa passado dez segundos, aproximadamente. É usado em amostras com bacilos Gram negativo para diferenciar enterobactérias (oxidase negativa) de bacilos oxidase positiva, tal como *Pseudomonas spp* [28].

- **Teste da sensibilidade à Optoquina:** O teste da optoquina é usado para determinar o seu efeito antimicrobiano num determinado organismo. Esta lisa as moléculas de *S. pneumoniae*, podendo ser considerada uma identificação presuntiva apesar de já serem conhecidas algumas resistências. Após a cultura da amostra em questão numa placa com gelose de sangue, coloca-se um disco de optoquina e leva-se a incubar durante 18 a 24 horas a 35°C. Se a bactéria for susceptível à optoquina ocorre a formação de um halo de inibição com mais de 14mm [28].

- **PASTOREX™STREP:** Este teste da BIO-RAD faz a identificação dos antígenos específicos dos estreptococos de cada grupo de Lancefield (A, B, C, D, F, G) utilizando um método de extração enzimática. Deste modo, o antígeno presente no extrato obtido reconhece os anticorpos (ligados a partículas de latex) específicos do grupo a que pertence e o complexo antígeno-anticorpo aglutina.

- **Bichro-Latex albicans:** É um teste de coaglutinação em latex que faz a identificação rápida de *Candida albicans* e de *Candida dubliniensis*, a partir de cultura. O primeiro reagente que se adiciona à amostra é composto por partículas de latex ligadas a anticorpos monoclonais específicos que vão reagir com antígenos das leveduras presentes. O segundo reagente contém enzimas que vão separar as células e expor o antígeno, havendo aglutinação se na amostra estiverem presentes estas leveduras.

- **Api:** O Api é uma galeria de identificação padronizada baseada em reações bioquímicas (enzimáticas e/ou fermentação de açúcares) que ocorrem em microtubos com substratos desidratados, com testes específicos para cada espécie bacteriana em pesquisa. Após ocorrerem as reações, a leitura destas faz-se utilizando um quadro de leitura e a identificação é conseguida através de um catálogo ou sistema de identificação, sempre disponibilizados no kit. Neste setor de microbiologia usam-se vários mas o Api 20E, Api 20NE e Api NH são os mais frequentes, apesar de só serem realizados em algumas situações específicas. O Api 20E é usado para a identificação de enterobactérias, o Api 20NE para bacilos Gram-negativos não enterobactérias tal como *Pseudomonas spp* e *Acinetobacter spp*, e o Api NH faz a identificação de *Neisseria spp*, *Haemophilus spp* e *Moraxella catarrhalis* e permite também a biotipagem de *Haemophilus influenzae* e *Haemophilus parainfluenzae*.

## TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

Um antibiograma é um teste de sensibilidade aos antibióticos que se baseia na determinação da capacidade de um microrganismo em se multiplicar *in vitro*, na presença de um fármaco [29]. Pode ser realizado pelo Vitek2 ou de forma manual pelo método de Kirby-Bauer, E-test ou por ATBs (microtubos semelhantes ao Api). Além disso é realizado o Teste PBP2a onde se faz a identificação de *S. aureus* metilina resistentes (MRSA).

- **Método de Kirby-Bauer:** Este é um método de difusão que consiste num antibiograma manual realizado numa placa de petri com meio de Mueller-Hinton, onde se faz a inoculação de uma suspensão bacteriana (turvação igual a 0,5 MacFarland) pelo método de sementeira em toalha. Colocam-se de seguida discos de papel impregnados com os antibióticos para os quais se quer pesquisar a susceptibilidade e a placa fica a incubar a 35°C durante 18 a 24 horas. Após este tempo, se a bactéria for susceptível ao antibiótico forma-se um halo de inibição à volta do respectivo disco, não havendo crescimento desta. Contudo, se a bactéria for resistente não se forma qualquer halo, havendo crescimento normal na placa.

No caso das bactérias sensíveis, os halos são medidos e o seu tamanho é expresso em milímetros. Consultando tabelas próprias da EUCAST o resultado é dado como susceptível ou resistente [29].

Além deste meio é também usado o Mueller-Hinton com 5% de sangue de carneiro para determinar a susceptibilidade dos pneumococos (*S. pneumoniae*) e de outros estreptococos que requerem um suplemento de crescimento. No caso dos antifungogramas, usam-se discos com antifúngicos em vez de antibióticos e a inoculação é feita no meio RPMI.

- **E-test:** Este teste é semelhante ao método de Kirby-Bauer mas com a vantagem de permitir avaliar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) de cada antibiótico contra a estirpe bacteriana em causa, ou seja a concentração a partir do qual o crescimento é inibido. Em vez de se usar um disco de papel, este é substituído por uma tira impregnada com diferentes concentrações do antibiótico, sendo assim possível determinar a concentração a partir da qual já não há mais crescimento [29].

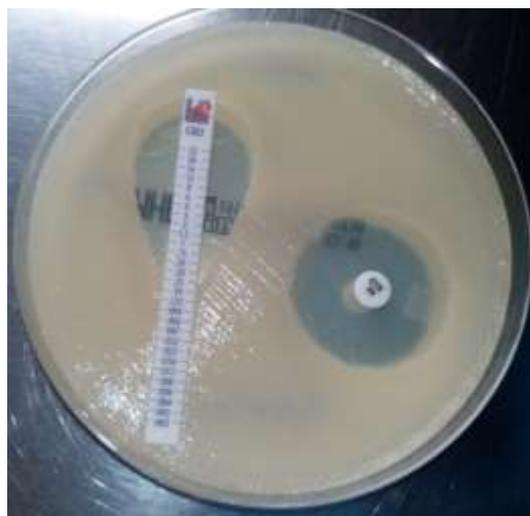


Figura 32 – E-test (à esquerda) e Método de Kirby-Bauer (à direita)

Fonte: SPC CHAA

- **ATB:** Estas galerias permitem determinar a sensibilidade de certas espécies bacterianas aos antibióticos em meio semi-sólido, ou seja, cada microtubo possui um antibiótico de interesse para a espécie em questão. Os testes mais frequentes são para a sensibilidade de *Haemophilus spp.*

- **Teste PBP2a:** Permite a detecção por imunocromatografia da PBP2a, ou seja, a proteína de ligação à penicilina 2a em isolados já identificados como *S. aureus*. Esta proteína é codificada pelo gene *mecA*, e as estirpes que o possuem denominam-se de MRSA (*S. aureus* meticilina resistentes) e são resistentes a todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos [30]. Este teste é então usado no sentido de auxiliar na identificação destas.

## **PESQUISA DE *Helicobacter pylori***

Além de todos os precedimentos padrão já referidos para cada tipo de amostra é também realizada a pesquisa de *Helicobacter pylori* através do *HeliProbe*, um teste respiratório validado que contém um dispositivo de colheita de CO<sub>2</sub> e um analisador. É administrada ao doente uma cápsula por via oral que contém <sup>14</sup>C marcado na ureia; a cápsula ingerida desintegra-se no estômago, a ureia marcada alcança a mucosa gástrica e, se *H. pylori* estiver presente a ureia marcada é metabolizada em CO<sub>2</sub> e amônia pela urease da bactéria. Deste modo o CO<sub>2</sub>, após o processo de respiração, é libertado na forma de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> pelo ar expirado e é medido no *HeliProbe*, sendo a ausência ou presença de bactéria determinada medindo a presença deste no ar expirado.

## **PESQUISA DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS**

A pesquisa de vírus respiratórios é realizada no *Maripoc* e inclui Adenovírus, Vírus sincicial respiratório, Influenza A e B, Parainfluenza 1, 2 e 3 e Metapneumovírus.

Este aparelho utiliza o método de fluorimetria e tem por base a identificação específica de antígenos virais por afinidade com anticorpos monoclonais ou policlonais purificados. O sinal de fluorescência medido pelo sistema de teste a partir da reação específica do analito está positivamente relacionado com o teor de antígeno da amostra. O sistema de teste

compara o sinal recebido do teste com os valores controle definidos pelo fabricante para um teste com resultados positivos.

## TESTES DE BIOLOGIA MOLECULAR

No laboratório de microbiologia faz-se a pesquisa de DNA, através da técnica de PCR em Tempo Real, no *Smart Cycler* e no *Genexpert*. Os diferentes microrganismos pesquisados nos dois aparelhos estão enumerados na tabela 5.

<b>Smart Cycler</b>	<b>Genexpert</b>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Clostridium diffile</i>
<i>Pneumocistis jirovecii</i>	Influenza A H1N1
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>S. aureus</i> Meticilia-resistente
	Enterovírus

Tabela 5 – Microrganismos pesquisados por Biologia molecular

No caso de *M. tuberculosis* quando o resultado é positivo no *Smart Cycler*, é confirmado no *Genexpert*, sendo também é possível pesquisar a sensibilidade à rifampicina, um dos antibióticos anti-tuberculosos mais usados e indicador de resistência.

A técnica de PCR em Tempo Real tem por base a amplificação de uma região específica de DNA, através do uso de oligonucleótidos complementares (*primers*) a essa sequência, e a sua replicação, aplicada repetidamente em vários ciclos para aumentar a sequência-alvo. Envolve 25 a 50 ciclos de repetições, em que cada um compreende três reações sequenciais que são a desnaturação dos ácidos nucleicos, a ligação dos *primers* à sequência-alvo e a extensão da sequência-alvo por ação da DNA polimerase. Como se trata de PCR em Tempo Real estes resultados podem ser acompanhados enquanto os ciclos ocorrem pois utilizam-se sondas marcadas com fluoróforos que, caso a sequência-alvo esteja presente e ocorra amplificação desses ácidos nucleicos, se ligam a eles e emitem fluorescência. O aumento desta fluorescência é proporcional à quantidade de DNA presente na amostra, sendo este resultado possível já que aparelhos usados combinam a amplificação dos ácidos nucleicos marcados com a medição qualitativa e quantitativa dos produtos amplificados [31].

## CONTROLO DE QUALIDADE

O controlo de qualidade interno é feito em todas as áreas do laboratório diariamente ou semanalmente, dependendo do tipo de teste em causa e da frequência com que o aparelho é utilizado. Há uma preocupação constante com estes controlos uma vez que são eles que avaliam a precisão e a viabilidade dos resultados obtidos diariamente. Este controlo interno tem como objetivo detetar problemas na rotina dos métodos aplicados no laboratório. Os produtos usados consistem em amostras fornecidas por laboratórios de referência e são materiais líquidos ou liofilizados que simulam as amostras usadas na rotina laboratorial, adequadas a cada aparelho e tipo de parâmetro a analisar.

Além disso é efetuado um controlo de qualidade externo para avaliar a exatidão dos resultados, através dos programas RIQAS e/ou NEQAS, que consiste em amostras enviadas por uma entidade independente e especializada. Estas também são líquidas ou liofilizadas, de origem humana, animal ou química, de acordo com cada parâmetro analisado nos diferentes aparelhos de cada valência. Estes controlos são realizados várias vezes por ano e a sua frequência (geralmente mensal) varia de acordo com os diferentes parâmetros que são controlados, sendo que o controlo destes é feito de forma isolada. O objetivo é comparar a performance do método do nosso laboratório com outros laboratórios. Os resultados obtidos são enviados de volta num documento próprio para serem confirmados e comparados com os valores referenciados de modo a avaliar a qualidade das análises efetuadas no serviço, uma vez que as entidades fornecem um relatório sobre a conformidade dos resultados.

- Microbiologia: O controlo interno é efetuado para avaliar o *Vitek*, onde se utilizam amostras ATCC enviadas por laboratórios de referência. Estas chegam com a identificação do microrganismo que se vai controlar e são colocadas no aparelho para se proceder à identificação e antibiograma, e ver se corresponde com a informação previamente conhecida. O controlo externo é realizado através do programa NEQAS que fornece amostras que simulam um doente, com o suposto diagnóstico. A partir daí, no caso do exame bacteriológico, faz-se a cultura nos meios usados na rotina laboratorial, a identificação e o antibiograma. São também controlados os exames parasitológicos, os testes rápidos e a biologia molecular. Os resultados são enviados de volta, para avaliar se os meios usados são apropriados para as culturas diárias e se o *Vitek* está a funcionar corretamente.

- Hematologia: O controlo interno é efetuado diariamente através do *XN CHECK™*, que possui três níveis de controlo (um alto, um médio e um baixo) para o hemograma e dois

níveis (um alto e um baixo) para a análise aos fluidos biológicos. O controlo externo faz parte do NEQAS e consiste no controlo dos diferentes parâmetros do hemograma, em que só o sangue total é controlado, do respetivo esfregaço sanguíneo e da velocidade de sedimentação. Para isto é enviada pela entidade uma amostra de sangue com a indicação de qual o parâmetro do hemograma a ser analisado, que é posteriormente reenviada com o respetivo resultado para comparação inter-laboratorial.

## CONCLUSÃO

O Mestrado em Análises Clínicas permitiu-me adquirir conhecimentos nas diferentes valências que compõem as análises de um laboratório e, de forma geral, são suficientes. A realidade prática é sempre diferente da teoria da faculdade e por isso é necessário saber consolidar os conhecimentos e aplicá-los à rotina laboratorial, contando para isso com a ajuda dos profissionais e colegas do serviço.

Este estágio proporcionou-me uma experiência alargada e enriquecedora tanto a nível profissional como pessoal. Através dela, tive a oportunidade de cimentar e utilizar conhecimentos adquiridos, na parte curricular, e em simultâneo munir-me de novos saberes. Durante estes cinco meses foi possível conhecer a realidade de um laboratório hospitalar, que abrange um maior fluxo de amostras, variedade de produtos biológicos e diversidade de patologias (que são diagnosticadas e/ou monitorizadas). Além disso esta experiência facultou-me o contacto direto com o mercado de trabalho.

No referido laboratório conheci pessoas extraordinárias, detentoras de um conhecimento vasto e que sempre me auxiliaram nas dificuldades quotidianas.

Findo este percurso, considero que foi uma experiência positiva e vantajosa a todos os níveis, realizada com empenho e dedicação, superando todas as minhas expectativas, e possibilitou-me ter certezas e determinações relativamente à área que quero investir futuramente no âmbito profissional.



## BIBLIOGRAFIA

- 1) MUNKER, Reinhold; HILLER, Erhard; GLASS, Jonathan; PAQUETTE, Ronald – Modern Hematology, Biology and Clinical Management – 2ª Ed, 2007, Humana Press, 1:15.
- 2) D., Ernest Beutler M. et al. – Williams Hematology – 6ª Ed, 2000, Mc Graw Hill, Color Plates.
- 3) KAUSHANSKY, Kenneth et al. – Williams Hematology – 8ª Ed, 2011, Mc Graw Hill, Part VI:29:411-421.
- 4) BAIN, J. Barbara; BATES, Imelda; LAFFAN, Michael A.; LEWIS, S. Mitchell - Dacie and Lewis Practical Haematology – 11ª Ed, 2011, Churchill Livingstone, 5: 83-85.
- 5) LOFFLER, H.; RASTETTER, J.; HAFERLACH, T. – Atlas of Clinical Hematology – 6ª Ed, 2005, Springer, IV:33-67.
- 6) KAUSHANSKY, Kenneth et al. – Williams Hematology – 8ª Ed, 2011, Mc Graw Hill, Part VII:59-63:875-915.
- 7) KAUSHANSKY, Kenneth et al. – Williams Hematology – 8ª Ed, 2011, Mc Graw Hill, Part VIII:67-68:989-999.
- 8) KAUSHANSKY, Kenneth et al. – Williams Hematology – 8ª Ed, 2011, Mc Graw Hill, Part IX:74-76:1079-1101.
- 9) KAUSHANSKY, Kenneth et al. – Williams Hematology – 8ª Ed, 2011, Mc Graw Hill, Part XII:114:1735.
- 10) LEWIS, SM.; BAIN, B.J.; BATES, I. – Dacie and Lewis Practical Haematology – 9ª Ed, 2001, Churchill Livingstone, 1:5.
- 11) KAUSHANSKY, Kenneth et al. – Williams Hematology – 8ª Ed, 2011, Mc Graw Hill, Part I:2:11-16.
- 12) <http://www.biomedicinabrasil.com/2011/03/esfregaco-sanguineo.html> (acedido a 8 de junho de 2015).
- 13) LEWIS, SM.; BAIN, B.J.; BATES, I. – Dacie and Lewis Practical Haematology – 9ª Ed, 2001, Churchill Livingstone, 22:530.
- 14) [http://www3.uma.pt/lgh/investigacao\\_hlas.html](http://www3.uma.pt/lgh/investigacao_hlas.html) (acedido a 5 de junho de 2015).
- 15) TILLE, Patricia M. – Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology – 13ª Ed, Elsevier, 2014, 49:642.
- 16) FORBES, Betty A.; SAHM, Daniel F.; WEISSFELD, Alice S. – Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology – 12ª Ed, Mosby, 2007, 7:95-99.
- 17) FORBES, Betty A.; SAHM, Daniel F.; WEISSFELD, Alice S. – Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology – 10ª Ed, Mosby, 1998, 1:16.

- 18) FORBES, Betty A.; SAHM, Daniel F.; WEISSFELD, Alice S. – Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology – 12ª Ed, Mosby, 2007, 16:257.
- 19) FONSECA, Ana Bruschy et al. – Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em Bacteriologia – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Programa Nacional de Controlo da Infecção, 2004.
- 20) FUKUSHIMA, H.; SHIMIZU, S.; INATSU, Y. – *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* detection in foods – Journal of Pathogens, Volume 2011 (2011), (acedido a 5 de junho de 2015) Disponível na internet: <http://www.hindawi.com/journals/jpath/2011/735308/>
- 21) FORBES, Betty A.; SAHM, Daniel F.; WEISSFELD, Alice S. – Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology – 12ª Ed, Mosby, 2007, 57:851.
- 22) FORBES, Betty A.; SAHM, Daniel F.; WEISSFELD, Alice S. – Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology – 12ª Ed, Mosby, 2007, 6:83-89.
- 23) <http://library.med.utah.edu/WebPath/HISTHTML/STAINS/STAIN017.html> (acedido a 27 de maio de 2015).
- 24) <http://library.med.utah.edu/WebPath/HISTHTML/STAINS/STAIN020.html> (acedido a 27 de maio de 2015).
- 25) FERREIRA, Wanda F. Canas; SOUSA, João Carlos F. de – Microbiologia Volume II- 1ª Ed, Lidel, 2000, 7:86,92-94.
- 26) FORBES, Betty A.; SAHM, Daniel F.; WEISSFELD, Alice S. – Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology – 12ª Ed, Mosby, 2007, 9:152.
- 27) FORBES, Betty A.; SAHM, Daniel F.; WEISSFELD, Alice S. – Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology – 12ª Ed, Mosby, 2007, 7:110.
- 28) FORBES, Betty A.; SAHM, Daniel F.; WEISSFELD, Alice S. – Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology – 12ª Ed, Mosby, 2007, 13:223, 238, 239.
- 29) FERREIRA, Wanda F. Canas; SOUSA, João Carlos F. de – Microbiologia Volume I- 1ª Ed, Lidel, 1998, 10:211-213.
- 30) TILLE, Patricia M. – Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology – 13ª Ed, Elsevier, 2014, 14:242.
- 31) FORBES, Betty A.; SAHM, Daniel F.; WEISSFELD, Alice S. – Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology – 12ª Ed, Mosby, 2007, 8:127-132.

## ANEXOS

### Microbiologia

- Coloração de Gram
  1. Fixar o esfregaço à chama
  2. Cobrir o esfregaço com cristal violeta durante 1 minuto
  3. Passar por água da torneira
  4. Cobrir com lugol durante 1 minuto para fixar
  5. Passar por água da torneira
  6. Descorar com acetona iodada
  7. Passar por água da torneira
  8. Cobrir com safradina durante 1 minuto
  9. Passar por água da torneira
  
- Coloração de Auramina
  1. Fixar à chama
  2. Cobrir o esfregaço com auramina durante 15 minutos
  3. Passar por água da torneira
  4. Cobrir o esfregaço com decolorante durante 2/3 minutos
  5. Passar por água da torneira e secar bem
  6. Cobrir o esfregaço com permanganato de potássio durante 5 minutos
  7. Passar por água da torneira
  
- Coloração de Ziehl-Neelsen
  1. Fixar à chama
  2. Cobrir o esfregaço com fucsina de Ziehl
  3. Aquecer à chama até à emissão de fumos brancos (evitar ferver)
  4. Deixar ficar durante 10 minutos
  5. Passar por água da torneira
  6. Cobrir o esfregaço com solução de Gabbett durante 1 minuto
  7. Passar por água da torneira

(Fonte: SPC CHAA)

## Hematologia

- Valores de referência do hemograma

Parâmetro	Intervalo de referência
Hemoglobina	H: $15 \pm 2$ g/dl M: $13,5 \pm 1,5$ g/dl
Eritrócitos	H: $5,0 \pm 0,5 \times 10^{12}/l$ M: $4,3 \pm 0,5 \times 10^{12}/l$
Hematócrito	H: $45 \pm 5$ % M: $41 \pm 5$ %
MCV	$92 \pm 9$ fl
MCH	$29,5 \pm 2,5$ pg
MCHC	$33 \pm 1,5$ g/dl
Reticulócitos	$0,5 - 2,5\%$ ou $50 - 100 \times 10^9/l$
Leucócitos	$4,0 - 10,0 \times 10^9/l$
• Neutrófilos	$2,0 - 7,0 \times 10^9/l$
• Linfócitos	$1,0 - 3,0 \times 10^9/l$
• Monócitos	$0,2 - 1,0 \times 10^9/l$
• Eosinófilos	$0,02 - 0,5 \times 10^9/l$
• Basófilos	$0,02 - 0,1 \times 10^9/l$
Plaquetas	$280 \pm 130 \times 10^9/l$

(Fonte: BAIN, J. Barbara; BATES, Imelda; LAFFAN, Michael A.; LEWIS, S. Mitchell - Dacie and Lewis Practical Haematology – 11ª Ed, 2011, Churchill Livingstone, 2:14)