

Nádia Filipa Arêde Marques

# **Relatório de Estágio em Análises Clínicas**

Relatório de Estágio realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de  
Farmácia da Universidade de Coimbra

Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar São João no Porto

**Orientadores:**

Doutora Teresa Carvalho

Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues Sousa

Julho, 2015

Universidade de Coimbra



## **AGRADECIMENTOS**

*Gostaria de agradecer ao Professor Doutor João Tiago Guimarães, Diretor do Serviço de Patologia Clínica do CHSJ, a oportunidade da realização do estágio e pela sua simpatia.*

*À Doutora Teresa Carvalho, minha orientadora externa, um muito obrigado por toda a dedicação, empenho e acompanhamento ao longo de todo o estágio.*

*Agradeço ainda a todas as pessoas do laboratório que se disponibilizaram para me ensinar e me receberam com simpatia.*

*Não poderia deixar de agradecer:*

*À Professora Doutora Leonor Almeida, coordenadora do Mestrado, que se mostrou sempre disponível a vários níveis ao longo destes dois anos.*

*À Professora Doutora Maria do Céu Sousa, minha orientadora interna, que foi crucial na finalização deste trabalho e por toda a motivação na reta final.*

*À minha família: pais, irmão, avós e tios, todo o apoio e toda a força. Sem eles nada disto tinha sido possível.*

*À Cláudia, Inês Gomes e Inês Moreira, as minhas melhores amigas que estiveram sempre lá para mim, incondicionalmente.*

*À Biotuna, o meu fantástico grupo de amigos que proporcionaram os melhores momentos da minha vida académica. À Cat e Ruiva, um especial obrigado por serem quem são para mim.*

*À Ana Cristina e Sara Armelim, pela paciência, carinho e amizade que tanto demonstraram.*



# ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	i
ÍNDICE DE TABELAS .....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT .....	v
I. INTRODUÇÃO .....	1
II. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO.....	2
III. MICROBIOLOGIA .....	3
Meios de Cultura .....	3
Técnicas de sementeira .....	8
Imunofluorescência.....	9
I. Bacteriologia.....	10
I.1. MÉTODO DE COLORAÇÃO DE GRAM.....	10
I.2. AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	10
I.2.1. Urina .....	10
I.2.2. Fezes .....	12
I.2.3. Líquidos Biológicos: Ascítico, Pleural e Articular .....	13
I.2.4. Líquido Cefalorraquidiano (LCR) .....	14
I.2.5. Sangue.....	14
I.2.6. Ponta de Catéter .....	15
I.2.7. Secreções Brônquicas e Lavados Brônquicos e Broncoalveolares.....	16
I.2.8. Exsudado Nasal .....	17
I.2.9. Exsudado Vaginal.....	17
I.3. IDENTIFICAÇÃO .....	18
I.3.1. Pesquisa Antigénica .....	18
I.3.2. Provas Bioquímicas .....	19
I.3.3. Provas Serológicas.....	22
I.3.4. Sistemas Automáticos .....	22
I.3.5. Pesquisa de Ácidos Nucleicos .....	23
I.4. SUSCETIBILIDADE .....	24
I.4.1. Métodos Manuais.....	24
I.4.2. Sistemas Automáticos .....	25
2. Micologia .....	26

2.1. EXAME MICROSCÓPICO .....	26
2.2. EXAME CULTURAL.....	26
2.3. IDENTIFICAÇÃO .....	27
2.3.1. Pesquisa de Oocistos de <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	27
2.3.2. Fungos Leveduriformes.....	27
2.3.2.1. Exame microscópico .....	27
2.3.2.2. VITEK® MS.....	27
2.3.2.3. VITEK® 2.....	27
2.3.3. Fungos Filamentosos .....	28
2.3.3.1. Técnica da Fita-Cola.....	28
3. Micobacteriologia.....	29
3.1. MÉTODOS DE COLORAÇÃO .....	29
3.1.1. Coloração por Auramina .....	29
3.1.2. Coloração de Kinyoun.....	29
3.2. PROCESSEMENTO DAS AMOSTRAS .....	30
3.2.1. Digestão/ Descontaminação .....	30
3.2.2. Exame Cultural .....	30
3.2.3. BACTEC™ MGIT™ 960 .....	31
3.3. IDENTIFICAÇÃO .....	31
3.3.1. AccuProbe® MYCOBACTERIUM TUBERCULOSE COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST	31
3.3.2. GenoType® <i>Mycobacterium</i> .....	32
3.4. ANTIBIOGRAMA .....	33
4. Parasitologia .....	35
4.1. AMOSTRAS BIOLÓGICAS .....	35
4.1.1. Sangue.....	35
4.1.1.1. Esfregaço Sangue Periférico .....	35
4.1.1.2. Teste Imunocromatográfico BinaxNOW® .....	36
4.1.2. Fezes .....	36
5. Virologia.....	38
5.1. Pesquisa Antigénica de Vírus Respiratórios .....	38
5.2. Pesquisa Antigénica de Citomegalovírus.....	39
5.3. Pesquisa Antigénica de Adenovírus e Rotavírus.....	40
IV. HEMATOLOGIA LABORATORIAL.....	42
Sangue .....	42
Líquidos Biológicos.....	42

Processamento das amostras.....	42
I. Hemograma .....	43
Equipamentos.....	43
Metodologias.....	45
I.1. ERITROGRAMA.....	46
Contagem de eritrócitos (RBC).....	46
Hematócrito (HCT).....	46
Hemoglobina (HGB).....	47
Índices Eritrocitários.....	47
Amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW).....	48
I.1.1. Anemia .....	48
Anemia Microcítica Hipocrômica .....	49
Anemia Normocítica e Normocrômica .....	50
Anemia Macroscítica .....	50
I.2. LEUCOGRAMA.....	51
I.3. PLAQUETOGRAMA .....	53
Volume Plaquetário Médio (MPV) .....	53
Dispersão do Volume Plaquetar (PDW).....	53
2. Estudo Morfológico do Sangue Periférico .....	54
Equipamentos.....	55
2.1. CellaVision™ DM96 .....	56
3. Velocidade de Sedimentação .....	57
Equipamentos.....	57
4. Procedimentos Complementares realizados em Hematologia Laboratorial .....	58
4.1. Microhematócrito.....	58
4.2. Pesquisa de Eosinófilos na Urina – Citoesfregaço.....	58
V. CONTROLO DE QUALIDADE.....	59
Controlo de Qualidade Interno (C.Q.I.).....	59
Avaliação Externa da Qualidade (A.E.Q.) .....	60
VI. CONCLUSÃO .....	61
VII. ANEXOS .....	vii
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	xiii



## **ABREVIATURAS**

A.E.Q. - Avaliação Externa de Qualidade

ATCC - *American Type Culture Collection*

BAAR - Bacilo-Álcool-Ácido-Resistente

BHI - Brain Heart Infusion

CAM - Gelose Campyloset

CHSJ - Centro Hospitalar de São João

CLED - Gelose Cystine Lactose Electrolyte Deficient

COS - Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro

CMV – Citomegalovírus

CV - Coeficiente de Variação

C.Q.I. - Controlo de Qualidade Interno

DC - Corrente Direta

DCO - Gelose D-Coccosel

Diff - Diferencial Leucocitário

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica

EBM – Etambutol

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

HBG – Hemoglobina

HCT – Hematócrito

hMPV - Metapneumovírus humano

HPLC - High Performance/Pressure Liquide Chromatography

HRPII - Proteína II rica em histidina

HTM - Haemophilus Test Medium

IF – Imunofluorescência

IFD - Imunofluorescência Direta

IFI - Imunofluorescência Indireta

IG - Granulócitos Imaturos

INH – Isoniazida

LCR - Líquido Cefalorraquidiano

MALDI TOF- Matrix Assisted Laser Desorption Ionização Time-of-flight

MCH – Hemoglobina Corpuscular Média

MCHC – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

MCK - Gelose MacConkey  
MCV – Volume Médio Corpuscular  
MH2 - Gelose Mueller Hinton 2  
MHS - Gelose Mueller Hinton 2 agar + 5% sangue de carneiro  
MIC - Concentração Mínima Inibitória  
MPV – Volume Plaquetar Médio  
MTBC - Complexo *Mycobacterium tuberculosis*  
MSA2 - Gelose Mannitol Salt 2  
NRBC - Eritrócitos Nucleados  
PDW - Dispersão do Volume Plaquetar  
PIV – Parainfluenzavírus  
PLT – Plaquetas  
PLT-O - Plaquetas Óticas fluorescentes  
pp65 - Fosfoproteína da matriz interna  
PVX - Gelose de Chocolate + PolyViteX  
PZA - Pirazinamida  
RBC – Red Blood Cell  
RDW – Red Cell Distribution Width  
RET – Reticulócitos  
RIF - Rifamicina  
RNA – Ácido Ribonucleico  
RF - Corrente de Radiofrequência  
SD - Desvio Padrão  
SGC2 - Gelose de Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol 2  
SIS - Sysmex Information System  
SLS - Lauril Sulfato de Sódio  
STR - Estreptomicina  
TSA - Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos  
UFC – Unidades Formadoras de Colônias  
UK NEQAS - United Kingdom National External Quality Assessment Service  
VRS - Vírus Respiratório Sincicial  
WBC – White Blood Cell  
YER - Gelose Yersinia

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela I</b> - Técnicas de sementeira realizadas no Laboratório de Microbiologia.....	8
<b>Tabela II</b> - Processamento laboratorial da amostra de urina colhida por micção. ....	11
<b>Tabela III</b> - Análise do exame cultural de urina colhida por micção e respetivos procedimentos. ...	11
<b>Tabela IV</b> - Processamento laboratorial de amostras fecais. ....	12
<b>Tabela V</b> - Processamento laboratorial dos diversos líquidos biológicos: ascítico, pleural e articular .....	13
<b>Tabela VI</b> - Processamento laboratorial de Líquido Cefalorraquidiano.....	14
<b>Tabela VII</b> - Procedimentos a efetuar após remoção dos frascos de Hemocultura do aparelho BACTEC™.....	15
<b>Tabela VIII</b> - Processamento laboratorial de catéteres. ....	15
<b>Tabela IX</b> - Avaliação da qualidade de amostras de secreções brônquicas ao microscópio ótico (ampliação de 100X). ....	16
<b>Tabela X</b> - Processamento Laboratorial de amostras do trato respiratório.....	17
<b>Tabela XI</b> – Processamento laboratorial de zangaratoas de exsudado nasal. ....	17
<b>Tabela XII</b> - Processamento laboratorial de zangaratoas de exsudado vaginal.....	18
<b>Tabela XIII</b> - Cartas de Identificação para VITEK® 2.....	23
<b>Tabela XIV</b> - Cartas de Sensibilidade aos Antimicrobianos utilizados no VITEK® 2 .....	25
<b>Tabela XV</b> - Procedimentos a realizar consoante a observação do exame cultural para fungos. ....	26
<b>Tabela XVI</b> - Inoculação das amostras em meio Löwenstein-Jensen. ....	31
<b>Tabela XVII</b> – Observação microscópica de parasitas sanguíneos.....	35
<b>Tabela XVIII</b> - Processamento laboratorial das amostras fecais para exame parasitológico.....	36
<b>Tabela XIX</b> - Parasitas intestinais observados após o Método de Sedimentação-Concentração.....	37
<b>Tabela XX</b> - Parâmetros de análise do Sysmex® XE-2100D™ e respetivas metodologias.....	43
<b>Tabela XXI</b> - Parâmetros de análise do Sysmex® XE-5000™ e respetivas metodologias.....	44
<b>Tabela XXII</b> - Causas mais frequentes das anemias microcíticas, normocíticas e macrocíticas.....	51
<b>Tabela XXIII</b> – Principais causas de Neutrofilia, Eosinofilia, Basofilia, Monocitose e Linfocitose ....	52
<b>Tabela XXIV</b> – Principais causas de Neutropenia e Linfopenia .....	52
<b>Tabela XXV</b> - Causas mais frequentes de Trombocitose e de Trombocitopenia.....	53
<b>Tabela XXVI</b> - Parâmetros que sugerem a realização de esfregaço de sangue periférico. ....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos .....	24
<b>Figura 2</b> – Observação microscópica de <i>Aspergillus flavus</i> . A) ampliação 100X e B) ampliação 400X. .....	28
<b>Figura 3</b> – Observação microscópica de Bacilo-Álcool-Ácido-Resistente (BAAR): A) Coloração por Auramina; B) Coloração de Kinyoun. ....	30
<b>Figura 4</b> - GenoType <i>Mycobacterium</i> : A) Complexo <i>M. tuberculosis</i> , MTBC e B) Common <i>Mycobacteria</i> /Adicional Species, CM/AS.....	33
<b>Figura 5</b> - Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp .....	37
<b>Figura 6</b> - Oocisto de <i>Cystoisospora belli</i> .....	37
<b>Figura 7</b> – Oocisto de <i>Cyclospora cayetanensis</i> .....	37
<b>Figura 8</b> - Lâmina referente ao painel dos vírus respiratórios. 1) Adenovírus; 2) Vírus Influenza A; 3) Vírus Influenza B; 4) PIV 1; 5) PIV 2; 7) PIV 3; 9) hMPV; 11) VRS .....	39
<b>Figura 9</b> - Observação do poço controlo para Adenovírus. A) Controlo Negativo; B) Controlo Positivo. ....	39
<b>Figura 10</b> - Pesquisa antigénica de Adenovírus e Rotavírus .....	41
<b>Figura 11</b> - Esquema de um esfregaço de sangue periférico.....	55
<b>Figura 12</b> – Exemplo de uma classificação para leucócitos sugerida pelo equipamento CellaVision™ DM96.....	56
<b>Figura 13</b> - Régua de leitura de microhematócrito.....	58

## **RESUMO**

O presente relatório tem como objetivo relatar as atividades desenvolvidas durante o estágio realizado no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

O estágio decorreu no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar de São João (CHSJ), no Porto e foi realizado em várias áreas, nomeadamente Microbiologia, Hematologia Laboratorial, Química Clínica e Imunologia.

O relatório aborda as áreas de Microbiologia e Hematologia Laboratorial, realçando a importância das diferentes análises, os equipamentos e metodologias utilizadas e a respetiva interpretação e validação dos resultados, referindo a importância da realização do controlo de qualidade.

Foi possível integrar uma rotina normal de trabalho aplicando vários conhecimentos e adquirir uma visão global relativamente à aplicabilidade clínica de um laboratório de análises clínicas inserido num hospital de referência como é o CHSJ.

## **ABSTRACT**

This report aims to describe the activities performed during the internship carried out as a part of Master's Degree in Clinical Analysis at the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra. The internship took place in the Clinical Pathology Unit of São João Hospital Centre (CHSJ) in Porto and covered several areas, more specifically Microbiology, Laboratory Hematology, Clinical Chemistry and Immunology. The report covers the areas of Microbiology and Laboratory Hematology, and aims at stressing the importance of different analyses, equipment and methods used, as well as at interpretation and validation of the results, with special attention paid to the importance of performing quality control. It was possible to establish a normal working routine by applying the acquired knowledge, as well as to develop an overall view of clinical applicability of a clinical analysis laboratory in a reference hospital such as CHSJ.



## I. INTRODUÇÃO

---

No âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra foi realizado um estágio que visava desenvolver competências e aprofundar conhecimentos na área das análises clínicas. Este estágio teve lugar no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar de São João no Porto, no período de Dezembro de 2014 a Maio de 2015 com duração de 704 horas.

As análises clínicas constituem a base do diagnóstico e monitorização dos doentes e, como tal, é necessário que seja imposto rigor nas três fases que precedem a cedência do resultado analítico: Fase Pré-Analítica, Fase Analítica e Fase Pós-Analítica. Os laboratórios encontram-se bastante automatizados, o que veio permitir uma diminuição do tempo de resposta, redução de determinados erros, determinação de mais parâmetros, etc.

O estágio permitiu aprofundar e adquirir novos conhecimentos e integrar a rotina laboratorial em determinados setores nas áreas de Microbiologia, Hematologia Laboratorial, Química Clínica e Imunologia.

O presente relatório aborda as áreas de Microbiologia e Hematologia Laboratorial, nas quais integrei de forma ativa a sua rotina laboratorial e adquiri conhecimentos na interpretação e validação de resultados. O respetivo controlo de qualidade e a sua importância também se encontra evidenciado no relatório.

Inicialmente, estive na Unidade Central de Colheitas do CHSJ para conhecer os procedimentos e normas que vigoram.

A Química Clínica possui diversos setores: o setor central, onde são realizadas as análises dos analitos comuns; setor das urinas; setor de HPLC (High Performance/Pressure Liquid Chromatography); setor de Rastreamento Bioquímico Pré-Natal; e laboratório de Endocrinologia. Nestes, fui confrontada com os fundamentos teóricos e manutenção dos equipamentos utilizados, assim como calibração e controlo de qualidade efetuado.

Na área de Imunologia, tive oportunidade de estar presente nos setores de Imunoalergologia, Serologia, Autoimunidade e Imunofixação e Nefelometria.

O laboratório de Biopatologia Molecular representa uma extensão do laboratório de Microbiologia e pude conhecer quais os microrganismos que são pesquisados através da deteção dos ácidos nucleicos pela técnica de PCR em Tempo Real.

## **II. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO**

---

O CHSJ é considerado o maior centro hospitalar da região Norte e encontra-se ligado à Faculdade de Medicina, desde a sua inauguração, o que o torna um hospital universitário.

O Serviço de Patologia Clínica do CHSJ integra o Centro de Medicina Laboratorial que compreende também o Serviço de Anatomia Patológica e o Serviço de Imunohemoterapia.

O Laboratório de Patologia Clínica está organizado em Áreas que se localizam em diversos pisos do hospital.

A receção dos produtos biológicos procedentes do Internamento e do Serviço de Urgência Geral realiza-se na Secretaria Central até as 20h. Após as 20h, durante os fins-de-semana e feriados, a receção é realizada no Laboratório Central.

A receção dos produtos biológicos de doentes em ambulatório realiza-se na Unidade Central de Colheitas.

O serviço de Urgência Laboratorial está localizado no Laboratório Central e funciona ininterruptamente.

A equipa de trabalho do Laboratório de Patologia Clínica do CHSJ, sob a direcção e coordenação do Professor Doutor João Tiago Guimarães, está formada por: 19 Médicos especialistas, 8 médicos internos de Formação Específica do CHSJ, 8 Técnico Superiores de Saúde, 41 Técnicos de Análise e Diagnóstico (3 dos quais com exercício exclusivo na Unidade Central de Colheitas), 14 assistentes técnicos e 12 assistentes operacionais.

### **III. MICROBIOLOGIA**

---

No Laboratório de Microbiologia do CHSJ são recebidas em média 475 amostras por dia. Para cada amostra é fundamental que exista uma verificação e confirmação da identificação da amostra com a respetiva requisição. É também importante verificar se a colheita foi efetuada em recipiente adequado e se o transporte foi bem efetuado. As amostras são triadas no sistema informático para acusar a sua receção ao laboratório e são impressas as etiquetas de identificação, fundamentais no processamento da análise microbiológica.

#### **Meios de Cultura**

No laboratório os meios de cultura são descritos como: a) meios de enriquecimento, permitem o crescimento da maioria dos organismos; b) meios seletivos, destinados à recuperação de organismos que podem estar presentes numa amostra polimicrobiana, sendo suplementados com inibidores que suprimem o crescimento de organismos indesejados; c) meios diferenciais, através da adição de determinados substratos promovem a deteção de características bioquímicas importantes numa identificação preliminar.<sup>[1]</sup>

#### Meios líquidos

Os meios de cultura líquidos são preparados no laboratório e apresentam-se na forma de caldos de enriquecimento e permitem uma boa difusão de metabolitos que promove o crescimento dos microrganismos. Exemplos destes meios são:

- Caldo Tioglicolato de Sódio

Meio de cultura líquido utilizado para recuperar bactérias aeróbias e anaeróbias (estritas ou facultativas) que possam estar em quantidades baixas nas amostras. Para além de outros constituintes, é o suplemento de Hemina e Vitamina K que possibilita a recuperação das bactérias anaeróbias.<sup>[1]</sup> O crescimento pode ser observado pelo aparecimento de turvação no meio.

- Caldo de Carne

Meio de cultura líquido destinado ao crescimento de microrganismos anaeróbios.<sup>[2]</sup> A sua composição contém carne cozida e meio líquido Brain Heart Infusion (BHI). A ocorrência de turvação indica crescimento bacteriano.

- Caldo de Chocolate

Meio de cultura líquido muito nutritivo em que ao meio Brain Heart Infusion (BHI), previamente aquecido, é adicionado sangue de cavalo que pelo choque térmico resulta em hemólise dos glóbulos vermelhos responsável por uma coloração chocolate.<sup>[2]</sup> Os compostos libertados pela lise dos eritrócitos, Hemina e NAD são fundamentais ao crescimento de microrganismos fastidiosos, como é exemplo *Neisseria* spp e *Haemophilus* spp.<sup>[2]</sup>

- Caldo Tetrionato

Caldo nutritivo de enriquecimento destinado ao crescimento das espécies de *Salmonella* spp em amostras de fezes. Os sais biliares e o tiosulfato de sódio inibem o crescimento de bactérias Gram-positivo e outras Enterobactérias. Para dificultar o crescimento de microrganismos presentes na flora intestinal normal é adicionado iodo.<sup>[3]</sup>

- Caldo Middlebrook 7H9

Meio de cultura líquido utilizado para o isolamento e crescimento das micobactérias. É composto por sais, vitaminas, cofatores, albumina, catalase e glicerol. Possui também verde malaquite, inibidor do crescimento de outras bactérias.<sup>[4]</sup>

### Meios sólidos

Os meios sólidos permitem o crescimento de microrganismos e o isolamento de colónias. Ao contrário dos meios líquidos é possível a observação de aspetos importantes relativamente a estas colónias: morfologia, cor, odor, reações bioquímicas, etc. Exemplos destes meios são:

- Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro - COS

A gelose Columbia é um meio de isolamento que se destina a facilitar o crescimento de microrganismos mais exigentes. A adição de sangue de carneiro torna o meio nutritivo muito rico adaptado ao crescimento da maioria das espécies bacterianas, independentemente do metabolismo destas. A presença de sangue de carneiro permite a expressão da hemólise ( $\alpha$  ou  $\beta$  hemólise), critério de base para a orientação da identificação bacteriana.<sup>[2]</sup>

- Gelose de Chocolate + PolyViteX - PVX

Meio de isolamento particularmente recomendado para crescimento das estirpes fastidiosas, como por exemplo, *Neisseria* spp, *Haemophilus* spp, *Streptococcus pneumoniae*. Composto por

uma base nutritiva enriquecida com os fatores X (hemina) e V (NAD) fornecidos pela hemoglobina e pelo PolyViteX.<sup>[2]</sup>

- Gelose MacConkey - MCK

A gelose de MacConkey é um meio seletivo e diferencial para isolamento de bactérias Gram-negativo (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp, etc.).<sup>[2]</sup> Permite evidenciar a fermentação de lactose pela viragem do indicador vermelho neutro. Microrganismos fermentadores da lactose originam colónias rosas a vermelhas, por vezes contornadas por um halo de sais biliares. Os microrganismos que não fermentam a lactose dão origem a colónias incolores. O caráter seletivo é proporcionado pelos sais biliares e o cristal violeta, inibidores das bactérias Gram-positivo.<sup>[3]</sup>

- Gelose Cystine Lactose Electrolyte Deficient - CLED

Meio recomendado para o isolamento de microrganismos do trato urinário. É diferencial pois permite diferenciar as bactérias que fermentam a lactose das não fermentadoras através do indicador azul de bromotimol. Colónias amarelas-pálidas são características das bactérias fermentadoras, devido a acidificação do meio. As não fermentadoras podem originar colónias verdes, azuis ou incolores.<sup>[5]</sup> Importa referir que a composição pobre em eletrólitos deste meio previne a invasão por *Proteus* spp, um agente patogénico comum das infeções do trato urinário.<sup>[2]</sup>

- Gelose SS

Meio seletivo e diferencial de isolamento para *Salmonella* spp e *Shigella* spp a partir de amostras fecais.<sup>[2]</sup> Permite evidenciar colónias de bactérias que fermentam a lactose e reduzem o tiosulfato, produzindo sulfeto de hidrogénio (H<sub>2</sub>S).

Os microrganismos que fermentam a lactose dão origem a colónias rosas, os não fermentadores originam colónias incolores. As colónias que possuem um centro negro são características dos produtores de H<sub>2</sub>S. Sendo assim, a presença de colónias incolores ou ligeiramente coloridas (amarelo pálido) com ou sem centro negro indica a possibilidade de se tratar de *Salmonella* spp e a presença de colónias incolores, rosa pálido ou alaranjadas sem centro negro é sugestivo de *Shigella* spp. A inibição de bactérias Gram-positivo é conseguida pela mistura de sais biliares e de corantes.<sup>[3]</sup>

- Gelose Campyloset - CAM

Meio seletivo para o isolamento de *Campylobacter* intestinal (*C. jejuni* e *C. coli*) a partir de amostras de fezes. A presença de sangue de carneiro facilita o crescimento das espécies a pesquisar. Colónias características deste microrganismo são de tamanho pequeno, acinzentadas e por vezes estendem-se ao longo das estrias de inoculação. Os antibacterianos e antifúngicos presentes no meio inibem a maior parte das bactérias e fungos.<sup>[3]</sup>

- Gelose Yersinia - YER

Meio de isolamento seletivo destinado à deteção de *Yersinia* spp a partir de amostras de fezes. O manitol e o vermelho neutro permitem uma diferenciação de *Yersinia* pela coloração das colónias. As que fermentam o manitol apresentam colónias rosa escuro a vermelhas ou incolores com centro colorido, podendo também ser contornadas por uma zona de precipitado. A presença de colato, desoxicolato, cristal violeta, Irgasan e de antibacterianos inibe o desenvolvimento das bactérias Gram-positivo e da maioria das Gram-negativo.<sup>[3]</sup>

- Gelose D-Coccosel - DCO

A gelose DCO (Bílis Esculina Ágar) destina-se ao isolamento seletivo e à diferenciação dos *Enterococcus* spp a partir de amostras polimicrobianas.

As colónias destas bactérias são incolores ou cinzentas e rodeadas por um halo negro, devido à hidrólise da esculina. A seletividade do meio em relação às bactérias Gram-negativo é assegurada pela azida sódica e a bílis que inibem algumas bactérias Gram-positivo, com exceção dos *Enterococcus* spp.<sup>[3]</sup>

- Gelose Mannitol Salt 2 - MSA2

Meio de isolamento seletivo e diferencial para *Staphylococcus* spp permitindo uma orientação para a identificação de *S. aureus* devido à fermentação do manitol por parte deste microrganismo (colónias amarelas). O alto teor de cloreto de sódio presente no meio limita o crescimento de outras bactérias.<sup>[3]</sup>

- Gelose Granada

O meio BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium) é um meio seletivo e diferencial utilizado para o isolamento de *Streptococcus agalactiae* em amostras clínicas. Através da produção de um pigmento cor de laranja por este microrganismo é possível diferenciar as suas colónias das restantes bactérias.<sup>[6]</sup>

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

Meio utilizado no laboratório para a realização de provas manuais de suscetibilidade aos antibacterianos pelo método de difusão em disco e com tiras Etest® para *Streptococcus* spp e *Neisseria meningitidis*.

- Gelose Mueller Hinton 2 - MH2

Meio utilizado no laboratório para a realização de provas manuais de suscetibilidade aos antibacterianos pelo método de difusão em disco e com tiras Etest® para *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepaciae*, *Staphylococcus* spp e *Enterococcus* spp.

- Haemophilus Test Medium – HTM

Meio específico usado para a realização da prova de suscetibilidade aos antibacterianos relativamente a *Haemophilus* spp.

- Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol 2 – SGC2

Meio seletivo recomendado para o isolamento de leveduras e fungos.<sup>[7]</sup> A presença de gentamicina e cloranfenicol inibem o crescimento de bactérias.

- Meio de Löwenstein-Jensen – LJ

Meio de cultura sólido usado para o isolamento de *Mycobacterium* spp, sendo constituído com os nutrientes essenciais para o seu crescimento. Utiliza o verde malaquite para a inibição de outras bactérias que possam estar presentes na amostra.<sup>[3]</sup>

#### Frascos de Hemocultura - BD BACTEC™

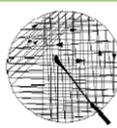
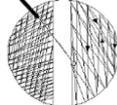
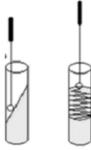
Os meios BD BACTEC™ Plus Aerobic/F Culture Vials e Plus Anaerobic/F Culture Vials são utilizados para a cultura aeróbia e anaeróbia e isolamento de bactérias no sangue. Estes frascos contêm diversos constituintes, dos quais se salientam o meio líquido de soja-caseína digerida e compostos que neutralizam os antibióticos.<sup>[8]</sup> Possuem um sensor químico que deteta aumentos no dióxido de carbono, produzidos pelo crescimento dos microrganismos, que determinará a existência presuntiva de organismos viáveis na amostra. Existem também os frascos BD BACTEC™ Mycosis-IC/F Culture Vials utilizado para a cultura e recuperação de leveduras e fungos e BD BACTEC™ Myco/F Lytic para o isolamento de micobactérias. Este é constituído pelo meio Middlebrook 7H9 e de Infusão Cérebro Coração, citrato de amónia

férrico como fonte de ferro para potenciar o crescimento e isolamento, saponina como agente de lise e proteínas e açúcares específicos para fornecerem suplementos nutritivos.<sup>[8]</sup> Este frasco possui um sensor capaz de detetar diminuições na concentração de oxigénio proveniente do metabolismo e crescimento dos microrganismos, que através de instrumentos especializados indicará a presença de organismos viáveis no frasco.

### Técnicas de sementeira

No laboratório são realizadas diversas técnicas para semear os diferentes meios de cultura (Tabela I). Consoante o que se pretende, o técnico microbiologista aplica a técnica adequada.

**Tabela I** - Técnicas de sementeira realizadas no Laboratório de Microbiologia.

Meio de Cultura	Sementeira	Finalidade	Esquema
Meios sólidos em Placa	Quantitativa	Quantificar o número de colónias obtidas	
	Esgotamento	Obter colónias isoladas	
	Rolamento	Obter um bom contacto do catéter com a superfície do meio	
	Toalha	Obter um crescimento homogéneo	
	Setores	Aumentar o número de colónias	
Meios sólidos em Tubo	Rampa	Observação das propriedades bioquímicas do microrganismo	
Meios líquidos	Dispersão	Crescimento dos microrganismos	

## **Imunofluorescência**

Em diferentes setores do Laboratório de Microbiologia (Bacteriologia, Micologia e Virologia) é utilizada esta metodologia para identificação dos vários microrganismos através da expressão dos respectivos antigénios.

A imunofluorescência (IF) é, então, uma técnica que utiliza anticorpos marcados com corantes fluorescentes, denominados por conjugados, para revelar a formação de um imunocomplexo antigénio-anticorpo que emite fluorescência, sendo esta visualizada ao microscópio ótico de fluorescência (ampliação 1000X - imersão). A técnica pode ser realizada por Imunofluorescência Direta (IFD), em que um conjugado de especificidade conhecida para o antigénio é adicionado a células infetadas pelo microrganismo, ou por Imunofluorescência Indireta (IFI), onde primeiramente são adicionados às células infetadas anticorpos específicos não-marcados e, após incubação e lavagem para remoção dos anticorpos não ligados é colocado o conjugado específico para o anticorpo usado.<sup>[9]</sup>

## **I. Bacteriologia**

O diagnóstico laboratorial bacteriano é essencial no estabelecimento da etiologia das diversas patologias por possuir a capacidade de identificação do agente patogénico e testar a sua sensibilidade *in vitro* a antimicrobianos.

De acordo com a amostra biológica, esta deve ser sujeita aos exames macroscópico, microscópico e ao exame cultural.

Após a receção no laboratório as amostras são triadas e na respetiva requisição são registados os seguintes parâmetros: observações, caso existam, relativamente ao exame macroscópico; realização de um esfregaço numa lâmina para o exame microscópico; e os meios semeados correspondentes ao exame cultural.

### **I.1. MÉTODO DE COLORAÇÃO DE GRAM**

A coloração pela técnica de Gram permite diferenciar as bactérias Gram-negativo das Gram-positivo com base na composição da parede celular, que é formada, entre outras substâncias, por um complexo macromolecular denominado peptidoglicano. As bactérias Gram-positivo por apresentarem uma camada espessa de peptidoglicano não são facilmente descoradas e retêm o primeiro corante, cristal violeta, adquirindo uma cor roxa. As bactérias Gram-negativo possuem uma fina camada de peptidoglicano, são descoradas pelo diferenciador (álcool-acetona) e adquirem a cor rosa pela retenção do segundo corante, safranina.<sup>[10]</sup> A observação ao microscópio (ampliação de 1000X - imersão) possibilita ainda conhecer a forma das bactérias (cocos e bacilos) e se adotam algum tipo de agrupamento (pares, em cacho, em cadeia).

### **I.2. AMOSTRAS BIOLÓGICAS**

#### **I.2.1. Urina**

As infeções do trato urinário são consideradas uma das infeções bacterianas mais comuns e a urina uma das amostras mais frequentemente submetida a cultura. Em virtude da colonização da uretra por bactérias, o primeiro jato de urina deve ser rejeitado e, devido à possibilidade dos agentes patogénicos do trato urinário poderem multiplicarem-se na urina, o transporte de amostra para o laboratório deve ser imediato para ser processada adequadamente (Tabela II).<sup>[2]</sup>

**Tabela II** - Processamento laboratorial da amostra de urina colhida por micção.

<b>Exame Macroscópico</b>	Evidenciar a presença de sangue e/ou pús	
<b>Exame Microscópico</b>	Não aplicável	
<b>Exame Cultural</b>	Meios de Cultura	Gelose CLED
	Processamento	Sementeira quantitativa (ansa 1 µl)
	Incubação	35°C ± 2°C com O <sub>2</sub>

Os agentes etiológicos mais frequentes das infeções do trato urinário pertencem ao grupo das Enterobactérias, nomeadamente *Escherichia coli* e em doentes hospitalizados com determinados fatores de risco (ex. algiação permanente, cálculos urinários, etc.) o leque de agentes etiológicos alarga-se a outros microrganismos como *Pseudomonas* spp, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus coagulase negativa* em casos específicos do serviço de nefrologia.<sup>[2]</sup> Após as 24 horas de incubação, as urinas semeadas são retiradas da estufa e são analisadas e consoante o que for encontrado são efetuados diferentes procedimentos (Tabela III). Se a urina for colhida por punção suprapúbica, esta deve ser semeada com uma ansa de 10 µl, aumentando a sensibilidade e é valorizada qualquer contagem.<sup>[2]</sup>

**Tabela III** - Análise do exame cultural de urina colhida por micção e respetivos procedimentos.

<b>Análise do Exame Cultural</b>		
<b>Ausência de crescimento após 24 horas de incubação</b>	Reincubação	
<b>Ausência de crescimento após 48 horas de incubação</b>	Resultado Negativo	
<b>Crescimento ≥10<sup>5</sup> UFC</b>	1 Tipo de colónias	Identificação
	2 Tipos de colónias	Isolamento de cada tipo a novos meios
	>2 Tipos de colónias	Decisão médica
<b>Crescimento entre 10<sup>4</sup> e 10<sup>5</sup> UFC</b>	1 Tipo de colónias	Identificação
	2 ou mais tipos de colónias	Rejeição

### 1.2.2. Fezes

As infecções do aparelho gastrointestinal podem ser causadas por uma grande variedade de bactérias.

O processamento desta amostra para exame bacteriológico (Tabela IV) tem como finalidade o despiste rotineiro das bactérias *Salmonella* spp e *Shigella* spp, mas caso seja requerido pelo clínico são pesquisadas as bactérias *Campylobacter jejuni/coli* e *Yersinia enterocolítica*.

**Tabela IV** - Processamento laboratorial de amostras fecais.

<b>Exame Macroscópico</b>	Constituição da amostra: fezes moldadas ou diarreicas; sanguinolentas, com ou sem muco ou aquosas		
<b>Exame Microscópico</b>	Não aplicável		
<b>Exame Cultural</b>	Meios de Cultura	Líquidos	Caldo Tetrionato (adição de iodo)
		Sólidos	Gelose MCK; Gelose SS; Gelose CAM; 2 Gelose YER; Gelose DCO*
	Processamento	Fezes sólidas	Sementeira da suspensão por esgotamento
		Fezes líquidas	Sementeira por esgotamento
	Incubação	MCK SS YER Tetrionato	35°C ± 2°C com O <sub>2</sub>
		DCO	35°C ± 2°C em atmosfera capnófila
		CAM	35°C ± 2°C em atmosfera microaerófila
		YER	Temperatura ambiente

\*amostra proveniente da Unidade de Neutropénicos.

No exame bacteriológico de fezes o mais provável ocorrer é o isolamento de bactérias Bacilo Gram-negativo, lactose negativas em MCK sugestivas de *Shigella* spp e *Salmonella* spp, pedindo o clínico subcultura para gelose de Kligler (prova de Kligler) e gelose de Ureia (prova da Ureia) de modo a estudar algumas características bioquímicas antes de requerer a identificação serológica.<sup>[2]</sup>

O facto de serem inoculadas duas geloses YER, uma incubada na estufa e outra à temperatura ambiente, auxilia na valorização dos resultados pelo clínico, uma vez que *Yersinia enterocolitica* possui uma temperatura ótima de crescimento entre 25°C e 28°C.<sup>[11]</sup>

A incubação da gelose CAM é realizada em atmosfera de microaerofilia (5% de O<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub> e 85% de N<sub>2</sub>) conseguida por um dispositivo comercial, gerador de gases, que é colocado no interior de uma jarra de incubação contendo o meio de cultura semeado.<sup>[2]</sup>

Nas amostras provenientes da Unidade de Neutropénicos, *Enterococcus faecalis* é algumas vezes isolado.

### 1.2.3. Líquidos Biológicos: Ascítico, Pleural e Articular

Os líquidos biológicos são normalmente estéreis e qualquer microrganismo encontrado deve ser investigado. A interpretação final deve ter em conta o estado clínico do doente e o microrganismo isolado.<sup>[2]</sup> As amostras devem ser enviadas de imediato para o laboratório e de acordo com o tipo de líquido, são devidamente processadas (Tabela V).

**Tabela V** - Processamento laboratorial dos diversos líquidos biológicos: ascítico, pleural e articular

<b>Exame Macroscópico</b>	Evidenciar a presença de sangue e/ou pús; Volume superior a 5ml concentrar por centrifugação		
<b>Exame Microscópico</b>	Efetuar esfregaço e corar pelo método de Gram		
<b>Exame Cultural</b>	Meios de Cultura	Líquidos	Caldo Tioglicolato; Caldo de Carne*
		Sólidos	Gelose COS; Gelose MCK; Gelose PVX**
	Processamento	Líquidos	Sementeira por dispersão
		Sólidos	Sementeira por esgotamento
	Incubação	Líquidos	35°C ± 2°C com O <sub>2</sub>
		Sólidos	35°C ± 2°C em atmosfera capnofílica

\*se amostra em condições de anaerobiose; \*\*se líquido articular.

Estas amostras são colhidas por métodos de punção e, por isso, os agentes colonizadores da pele, *Staphylococcus epidermidis* e *Corynebacterium* spp, se identificados não devem ser valorizados. As Enterobactérias, *S. aureus* e *Pseudomonas* spp são os agentes mais isolados nos líquidos ascítico, pleural e articular.

O líquido articular é semeado em gelose de chocolate PVX de modo a possibilitar o crescimento de *Haemophilus* spp.<sup>[2]</sup> A ocorrência de microrganismos anaeróbios é muito rara.

### 1.2.4. Líquido Cefalorraquidiano (LCR)

No líquido cefalorraquidiano é mais frequente a ocorrência de meningites víricas do que bacterianas. No entanto, a meningite bacteriana constitui uma situação grave se não tratada atempadamente e por isso deve ser enviada ao laboratório e processada de imediato <sup>[2]</sup> (Tabela VI).

Os agentes causadores mais comuns de meningite bacteriana em adultos jovens saudáveis são *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus spp* e *Streptococcus pneumoniae*.<sup>[2]</sup>

**Tabela VI** - Processamento laboratorial de Líquido Cefalorraquidiano.

<b>Exame Macroscópico</b>	Evidenciar a presença de sangue e/ou pús; Volume superior a 5ml concentrar por centrifugação		
<b>Exame Microscópico</b>	Efetuar esfregaço e corar pelo método de Gram		
<b>Exame Cultural</b>	Meios de Cultura	Líquido	Caldo de Chocolate
		Sólidos	2 Gelose COS*; Gelose PVX
	Processamento	Líquido	Sementeira por dispersão
		Sólidos	Sementeira por esgotamento
	Incubação	Líquidos	35°C ± 2°C com O <sub>2</sub>
		Sólidos	35°C ± 2°C em atmosfera capnófila

\*Prova de esterilidade do caldo de chocolate em Gelose COS.

### 1.2.5. Sangue

A análise bacteriológica ao sangue é pedida pelo clínico quando existe suspeita de bacteriemia. A colheita deve ser efetuada utilizando técnicas assépticas de forma a diminuir a possibilidade de contaminação.<sup>[2]</sup> O sangue é colhido em frascos apropriados para o efeito, nomeadamente Frascos de hemocultura BD BACTEC™ Plus Aerobic/F Culture Vials e Plus Anaerobic/F Culture Vials que são enviados de imediato ao laboratório e colocados o mais rapidamente possível no instrumento da série fluorescente BACTEC™ para a incubação e monitorização. Durante o período de duração do protocolo do teste, os frascos são automaticamente testados a cada dez minutos. A presença de um sensor químico no interior dos frascos, que deteta aumentos no dióxido de carbono produzido pelo crescimento dos microrganismos permite determinar e identificar culturas presumidamente positivas.<sup>[2]</sup>

A determinada altura e por diversas razões os frascos são retirados do aparelho e são efetuados os respetivos procedimentos descritos na Tabela VII.

**Tabela VII** - Procedimentos a efetuar após remoção dos frascos de Hemocultura do aparelho BACTEC™.

<b>Resultados dados pelo BACTEC</b>	<b>Procedimentos</b>
<b>Assinala Positividade</b>	Efetuar esfregação e corar pelo método de Gram; Subcultura em Gelose COS
<b>Assinala Negatividade (fim da duração do protocolo)</b>	Resultado dado como Negativo

O patologista confirma ou não a existência de microrganismos pelo Gram e pela observação da cultura em gelose de sangue (COS) e valoriza de acordo com o histórico clínico do doente, serviço, etc. Caso existam dúvidas deve esperar-se pelo resultado da segunda hemocultura, colhida a partir de uma segunda punção num braço diferente da primeira.

Tendo em conta a esterilidade desta amostra não é frequente a presença de microrganismos, mas nos casos em que tal ocorre, as bactérias *S. aureus*, *S. agalactiae*, *E. coli* e *Klebsiella* spp são as mais frequentemente isoladas no laboratório.

#### 1.2.6. Ponta de Catéter

As infeções relacionadas a catéteres devem ser diagnosticadas rapidamente, devido ao comum desenvolvimento de bacteriémias. O processamento desta amostra (Tabela VIII) inclui uma sementeira por rolamento de modo a aumentar a superfície de contato e possibilitar a obtenção de colónias isoladas.

Devido ao facto do catéter estar em contacto com a pele, *S. epidermidis* é o microrganismo que frequentemente isolado nesta situação. A ocorrência de outro microrganismo é valorizável.

**Tabela VIII** - Processamento laboratorial de catéteres.

<b>Exame Macroscópico</b>	Não aplicável	
<b>Exame Microscópico</b>	Não aplicável	
<b>Exame Cultural</b>	Meio de Cultura	Gelose COS
	Processamento	Sementeira por rolamento
	Incubação	35°C ± 2°C em atmosfera capnofílica

### 1.2.7. Secreções Brônquicas e Lavados Brônquicos e Broncoalveolares

As infecções do aparelho respiratório são muito frequentes e embora a maioria seja de origem viral, uma fração significativa é causada por bactérias.<sup>[2]</sup> As secreções brônquicas devem ser examinadas ao microscópio para avaliar a sua qualidade (Tabela IX) e, dependendo desta, o exame cultural é valorizado ou rejeitado. Esta região possui uma flora microbiana variada e abundante, sendo que muitos patógenos colonizam o local sem produzir uma real infecção, por exemplo *Streptococcus pyogenes*.<sup>[2]</sup> A presença de células epiteliais indica que a amostra foi contaminada com saliva e é necessário evitar esta contaminação visto que as bactérias na presença de saliva podem crescer excessivamente ou inibir o crescimento do verdadeiro agente infeccioso.

**Tabela IIX-** Avaliação da qualidade de amostras de secreções brônquicas ao microscópio ótico (ampliação de 100X).

<b>Avaliação da qualidade de amostras de secreções brônquicas</b>	
<b>Células epiteliais &gt;10 /campo</b>	Amostra Rejeitada*
<b>Células epiteliais &lt;10/campo</b>	Amostra Aceite

\*Amostra valorizada se pacientes com Fibrose Quística, Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) ou Bronquiectasias.

O processamento laboratorial das amostras do trato respiratório encontra-se descrito na Tabela X.

A existência de uma diversa flora bacteriana no trato respiratório superior exige ao clínico conhecimentos que permita ignorar esses microrganismos e valorizar os responsáveis pela infecção como *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae*. As Enterobactérias e *Pseudomonas* spp também podem ser agentes destas infecções.<sup>[12]</sup>

**Tabela X** - Processamento Laboratorial de amostras do trato respiratório.

<b>Exame Macroscópico</b>	Evidenciar presença de sangue e/ou pús		
<b>Exame Microscópico</b>	Efetuar esfregaço e corar pelo método de Gram		
<b>Exame Cultural</b>	Meios de Cultura	Gelose COS; Gelose PVX; Gelose MCK; Gelose MSA2*	
	Processamento	Secreções B.	Sementeira por esgotamento
		Lavados B.	Sementeira quantitativa
Incubação	35°C ± 2°C em atmosfera capnófila		

\*se doentes com Fibrose Quística.

### 1.2.8. Exsudado Nasal

Ao laboratório chegam zaragoas do exsudado nasal para serem processadas (Tabela XI) apenas para rastreio de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina.

**Tabela XI** – Processamento laboratorial de zaragoas de exsudado nasal.

<b>Exame Macroscópico</b>	Não aplicável		
<b>Exame Microscópico</b>	Não aplicável		
<b>Exame Cultural</b>	Meios de Cultura	Gelose COS; Gelose MSA2	
	Processamento	Sementeira por esgotamento	
	Incubação	35°C ± 2°C em atmosfera capnófila	

### 1.2.9. Exsudado Vaginal

São diversos os microrganismos bacterianos que constituem a flora vaginal e a sua composição sofre variações com a idade e com mudanças hormonais. Assim, *Lactobacillus* spp, algumas bactérias Gram positivo e bactérias Gram-negativo podem ser colonizadores a dada altura.<sup>[13]</sup> Na Tabela XII encontra-se descrito o processamento laboratorial das zaragoas de exsudados vaginais.

Em mulheres grávidas é efetuado o rastreio para pesquisa de *Streptococcus agalactiae* através da inoculação da amostra em gelose Granada. Não com o mesmo objetivo, *Neisseria gonorrhoeae* é também uma bactéria comumente procurada no laboratório.

**Tabela XII** - Processamento laboratorial de zaragoas de exsudado vaginal.

<b>Exame Macroscópico</b>	Não aplicável	
<b>Exame Microscópico</b>	Quando indicado, efetuar esfregaço e corar pelo método de Gram	
<b>Exame Cultural</b>	Meio de Cultura	Gelose COS; Gelose PVX; Gelose Granada
	Processamento	Sementeira por esgotamento
	Incubação	35°C ± 2°C em atmosfera capnófila

### 1.3. IDENTIFICAÇÃO

#### 1.3.1. Pesquisa Antigénica

##### a) Detecção de *Legionella pneumophila* por Imunofluorescência

MONOFLUO™ *Legionella pneumophila* IFA Test Kit consiste num teste de deteção e identificação de *L. pneumophila* em amostras clínicas para confirmação do diagnóstico da doença do legionário. As amostras do trato respiratório inferior são as apropriadas para a realização do teste que utiliza a metodologia de Imunofluorescência Direta.<sup>[9]</sup>

O reagente de coloração contém um anticorpo monoclonal marcado com isotiocianato de fluoresceína. Este anticorpo reage com uma proteína presente na membrana exterior de todos os serogrupos conhecidos desta bactéria.<sup>[9]</sup> Devem ser igualmente processadas as lâminas de controlo positivo separadamente dos esfregaços das amostras dos doentes.

Quando as amostras são observadas ao microscópico de fluorescência (ampliação 400X), *L. pneumophila* aparece sob a forma de bacilo ou cocobacilo intensamente verde fluorescente e os outros organismos de vermelho escuro.<sup>[9]</sup> O resultado é dado de uma forma qualitativa.

##### b) Detecção de *Streptococcus pneumoniae* e *Legionella pneumophila* por Cromatografia

O BinaxNOW® *Streptococcus pneumoniae* Antigen Card e o NADAL® *Legionella* Test são testes baseados em ensaios imunocromatográficos rápidos *in vitro* para a deteção do antígeno de *Streptococcus pneumoniae* e de *Legionella pneumophila* sorogrupos I, respetivamente, na urina de doentes com suspeita de pneumonia.

Na membrana de nitrocelulose estão adsorvidos os anticorpos contra a bactéria em questão e o anticorpo controlo.<sup>[14]</sup> Após a adição do reagente específico a amostra é colocada em contacto com a tira de teste durante 15 minutos.

Os resultados são interpretados pela presença ou ausência de linhas visualmente detetáveis de cor rosa/vermelha. Um resultado positivo inclui a deteção da linha de amostra e da linha de controlo, enquanto um resultado negativo produz apenas a linha de controlo.<sup>[14]</sup>

Estes testes podem ser essenciais para o diagnóstico numa fase inicial da infeção, uma vez que o antigénio, nomeadamente de *L. pneumophila*, consegue ser detetado na urina cerca de 3 dias após o início dos sintomas.<sup>[15]</sup>

### 1.3.2. Provas Bioquímicas

As seguintes provas bioquímicas são efetuadas para confirmar as suspeitas do patologista após observação do exame cultural, permitindo orientar a escolha das cartas adequadas de identificação e sensibilidade utilizadas no equipamento VITEK® 2.

## COCOS GRAM POSITIVO

Dentro deste grupo de bactérias destacam-se os géneros *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* e *Enterococcus* spp.

### a) Prova da Catalase

Após avaliação preliminar do crescimento das colónias microbiológicas, bem como a realização do esfregaço e coloração de Gram confirmando a presença de cocos Gram positivos ao microscópio ótico, a identificação e diferenciação dos géneros dos cocos Gram positivos é iniciada com a prova da catalase.

Esta prova consiste em verificar a presença da enzima catalase que medeia a hidrólise do peróxido de hidrogénio em água e oxigénio ( $H_2O_2 \rightarrow H_2O$  e  $O_2$ ).<sup>[2]</sup> Esta reação permite distinguir os grupos *Staphylococcus* spp (catalase positivo) dos *Streptococcus* spp e *Enterococcus* spp (catalase negativo).<sup>[9]</sup>

Na lâmina que contém a colónia pretendida é adicionada uma gota de peróxido de hidrogénio e é ou não observada a ocorrência de formação de bolhas de gás. Se houver presença de catalase, ou seja, ocorrer a formação de bolhas (reação positiva) é indicativo do género *Staphylococcus* spp. Caso não seja observada qualquer formação de bolhas (reação negativa) indica que pertencem aos géneros *Streptococcus* spp ou *Enterococcus* spp.<sup>[9]</sup>

#### b) Prova da Coagulase

A coagulase promove a conversão de fibrinogénio em fibrina. Esta característica permite distinguir a espécie *Staphylococcus aureus* das restantes *Staphylococcus* spp. (*Staphylococcus* coagulase negativa).<sup>[9]</sup>

O laboratório utiliza o kit Pastorex™ Staph Plus, um teste de aglutinação rápida para a deteção simultânea da afinidade para o antígeno do fibrinogénio (factor clumping), proteína A, e os polissacarídeos capsulares de *Staphylococcus aureus*.<sup>[2]</sup>

Após a colocação do reagente no cartão de teste e dissolvida a colónia suspeita se ocorrer aglutinação indica que o microrganismo contém coagulase e é indicativo de ser uma colónia de *Staphylococcus aureus*. Caso não seja observada este tipo de reação conclui-se que os microrganismos são *Staphylococcus* coagulase negativa.<sup>[2]</sup>

### BACILOS GRAM NEGATIVO

Na identificação de bacilos Gram negativo, a realização das seguintes provas bioquímicas é essencial para a distinção de Enterobactérias e entre Enterobactérias e *Pseudomonas* spp.

#### c) Prova da Oxidase

A enzima citocromo oxidase possui um papel essencial no sistema de transporte de eletrões durante a respiração aeróbia catalisando a oxidação de um citocromo reduzido pelo oxigénio molecular, resultando na formação de H<sub>2</sub>O e de um citocromo oxidado.<sup>[2]</sup> A prova baseia-se na deteção da produção intracelular da enzima oxidase pelas bactérias aeróbias e algumas anaeróbias facultativas, sendo importante para distinguir as *Enterobacteriaceae* das *Pseudomonas* spp.

A capacidade das bactérias produzirem esta enzima pode ser determinada pela adição do reagente dihidroclorato de tetrametil p-fenilenodiamina à colónia.<sup>[2]</sup> Caso ocorra desenvolvimento imediato de coloração púrpura é indicativo da produção de citocromo oxidase (reação positiva) por bactérias do género *Pseudomonas* spp. Na ausência da oxidase não ocorre mudança de cor (reação negativa) o que indica que as bactérias pertencem à família das *Enterobacteriaceae*.<sup>[2]</sup>

#### d) Prova da Ureia

No laboratório esta prova é efetuada quando é requerida uma subcultura para corroborar suspeitas relativas às bactérias *Shigella* spp e *Salmonella* spp, sendo a colónia semeada em rampa

num tubo que contem ureia de Christensen. Após incubação ( $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  com  $\text{O}_2$ ) este meio permite detetar se o microrganismo hidrolisa a ureia em amoníaco e água, ou seja, se são produtores da enzima urease.<sup>[16]</sup> Esta deteção é possível devido ao indicador de pH (vermelho de fenol) presente no meio. Um resultado positivo é obtido quando a ureia é hidrolisada a amónia e a sua acumulação torna o meio alcalino (aumento do pH), provocando uma mudança de cor de amarelo a rosa (ex. *Proteus* spp). A ausência de alteração da cor do meio é indicativa de um resultado negativo, isto é, ausência da enzima urease (ex. *Shigella* spp e *Salmonella* spp e outras Enterobactérias).<sup>[16]</sup>

#### e) Prova de Kligler

Meio utilizado para orientar a identificação das Enterobactérias, particularmente *Shigella* spp e *Salmonella* spp, permitindo detetar a fermentação da glucose e da lactose, a produção de sulfeto de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{S}$ ) e de gás.<sup>[16]</sup> Efetuado em gelose semi-inclinada, possibilita uma leitura após incubação ( $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  com  $\text{O}_2$ ) na profundidade e na superfície inclinada.

Na profundidade lê-se a fermentação da glucose, a produção de gás e de  $\text{H}_2\text{S}$ . A glucose, presente em fraca concentração no meio, é rapidamente utilizada pelas Enterobactérias provocando acidificação do meio com viragem do vermelho de fenol (indicador de pH) para amarelo. Esta acidez só é mantida na profundidade porque as condições de anaerobiose aí presentes impossibilitam a utilização dos aminoácidos como fonte alternativa de energia (situação ocorre na presença de  $\text{O}_2$ , superfície inclinada do meio, com alcalinização do meio e mudança da cor do indicador para vermelho). A produção de gás é demonstrada pela ocorrência de bolhas de gás que podem fragmentar a gelose e a produção de  $\text{H}_2\text{S}$  é detetada pela presença de um precipitado negro no meio (característico da *Salmonella* spp).<sup>[16]</sup>

Na superfície inclinada é lida a fermentação da lactose através da viragem do vermelho de fenol para amarelo. Esta acidificação é mantida durante o tempo de incubação porque a lactose está presente em elevada concentração (10x relativamente à glucose) e portanto as bactérias não necessitam de utilizar aminoácidos para obter energia (o que iria alcalinizar o meio e mudar o indicador de pH para a cor vermelha).<sup>[16]</sup> As bactérias *Shigella* spp e *Salmonella* spp, assim como as outras Enterobactérias que não fermentam a lactose, não provocam mudança de cor do meio nesta zona.<sup>[2]</sup>

#### f) Prova da Optoquina

A optoquina é uma substância que inibe o crescimento de *Streptococcus pneumoniae*.<sup>[2]</sup> Sendo esta prova baseada na sensibilidade desta bactéria para a optoquina.

É necessário efetuar uma suspensão do isolado (densidade 0,5 McFarland) que vai ser semeada em setores na gelose de sangue (COS) e o disco de optoquina é colocado no centro (incubação 18 a 24h a 37°C em atmosfera capnofílica).<sup>[2]</sup> Neste tipo de prova é feita a leitura do halo de inibição do crescimento bacteriano. A presença de halo  $\geq 19\text{mm}$  indica que a cultura é sensível à optoquina e presuntivamente *Streptococcus pneumoniae*.<sup>[2]</sup>

### **I.3.3. Provas Serológicas**

#### a) Soros de *Shigella* spp e *Salmonella* spp

Os soros são destinados à deteção serológica e determinação do serótipo da espécie de *Shigella* e *Salmonella* quando permanecem dúvidas após a observação do exame cultural e das provas de Kligler e Ureia. Apenas tive oportunidade de assistir à realização desta técnica de aglutinação em lâmina através de anticorpos específicos para *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* e *Shigella sonnei*.

Após colocação do anti-soro de teste e misturado com amostra bacteriana, se a estirpe de *Shigella* spp possuir o antigénio vai ocorrer ligação com o anticorpo específico. A reação antigénio-anticorpo resulta numa visível aglutinação.<sup>[2]</sup> O teste só pode ser valorizado se o controlo negativo permanecer opaco e leitoso.

### **I.3.4. Sistemas Automáticos**

#### a) VITEK® MS

Este sistema automatizado de identificação microbiana utiliza tecnologia MALDI TOF- Matrix Assisted Laser Desorption Ionização Time-of-flight. Num curto espaço de tempo, esta técnica de espectrofotometria de massa proporciona a identificação bacteriana ao nível da família, género e espécie. Isto é possível devido à existência de um base de dados representando a diversidade entre estirpes da mesma espécie.<sup>[17]</sup>

Após a observação do exame microscópico (se efetuado) e exame cultural, o clínico consoante o está presente no meio de cultura e tendo em conta os aspetos clínicos do paciente, pede para identificar a(s) colónia(s) através deste sistema.

O técnico microbiologista coloca essa(s) colónia(s) em poços no Card e adiciona uma matriz que evita a contaminação para os restantes poços. O Card é introduzido no aparelho em ambiente de alto vácuo e a amostra sofre uma ionização libertando proteínas que no final são detetadas por um sensor que gera um espetro que representa a composição de cada proteína.

O espectro obtido é comparado na base de dados aos perfis proteicos de referência específico das espécies.<sup>[17]</sup>

#### b) VITEK® 2

Este equipamento é um sistema totalmente automatizado que permite, com base no método de turbidimetria, a identificação bacteriana e a realização de Testes de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA) através de Cartas de Identificação (Tabela XIII) e de Sensibilidade (Tabela XIV), respetivamente.<sup>[18]</sup>

Para a realização das suspensões é necessário obter uma densidade de 3 McFarland para *Neisseria* spp e *Haemophilus* spp e 0,5 McFarland para as restantes bactérias e fungos numa solução NaCl 0,45%.<sup>[18;19]</sup>

As cartas e as suspensões das amostras são introduzidas no equipamento e no interior são transportadas para uma câmara de vácuo que permite que a suspensão seja aspirada e colocada nos poços da carta.<sup>[18]</sup>

O software Myla™ oferece relatórios em tempo real e integra os resultados da identificação obtidos pelo VITEK® MS com a correspondente informação fornecida pelo VITEK® 2.<sup>[21]</sup>

**Tabela XIII** - Cartas de Identificação para VITEK® 2.<sup>[20]</sup>

Cartas de Identificação
<b>GP:</b> Carta de Identificação para bactérias Gram-positivo
<b>GN:</b> Carta de Identificação para bactérias Gram-negativo
<b>NH:</b> Carta de Identificação para <i>Neisseria</i> spp e <i>Haemophilus</i> spp
<b>YST:</b> Carta de Identificação para fungos leveduriformes

#### 1.3.5. Pesquisa de Ácidos Nucleicos

No laboratório de biopatologia molecular é efetuada a deteção, identificação e quantificação de ácidos nucleicos dos diversos microrganismos (vírus, bactérias, fungos, parasitas) presentes em amostras de sangue, urina, líquidos orgânicos, secreções, biópsias e exsudados. Os procedimentos que se desenvolvem neste laboratório consistem na extração e purificação dos ácidos nucleicos e na sua amplificação através da técnica de PCR em tempo real.

## I.4. SUSCETIBILIDADE

### I.4.1. Métodos Manuais

#### a) Método de difusão: Kirby – Bauer

Este método tem como objetivo testar qualitativamente a suscetibilidade *in vitro* dos microrganismos aos antimicrobianos.<sup>[2]</sup> A partir de uma colônia isolada é realizada uma suspensão (NaCl 0,45%; 0,5 McFarland) e inoculada por sementeira em toalha nos meios de cultura respetivos onde são colocados os discos impregnados com uma concentração conhecida de antibiótico. Após incubação são medidos os halos de inibição e os resultados são dados como sensível, intermédio ou resistente.<sup>[2]</sup>

Esta prova de suscetibilidade manual é efetuada quando o resultado no VITEK® 2 é inconsistente ou para bactérias que o VITEK® 2 não possui a carta correspondente como por exemplo *Burkholderia cepaciae* e *Stenotrophomonas maltophilia*.

#### b) Método de transferência: Etest®

Ao contrário do método anterior, este teste quantifica a suscetibilidade *in vitro* dos microrganismos em relação aos antimicrobianos através da utilização de uma tira de plástico com um gradiente de concentrações pré-definidas do antimicrobiano (Figura 1).<sup>[18]</sup> A suspensão é realizada com as mesmas características do método de difusão (NaCl 0,45%; 0,5 McFarland) e realizada sementeira em toalha. A Concentração Mínima Inibitória (MIC) permite conhecer a concentração mais baixa que inibe o crescimento do microrganismo e a sua leitura e determinação é feita no ponto de interseção da tira e da elipse de inibição.<sup>[18]</sup>



**Figura 1** – Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos pelo método de tiras Etest®.

## I.4.2. Sistemas Automáticos

### a) VITEK® 2

Utiliza cartas com antimicrobianos em concentrações conhecidas direcionadas para um grupo específico de microrganismos (Tabela XIV). Assim, a informação dada pelo VITEK® MS ou pelas provas bioquímicas efetuadas é fundamental.

Disponibiliza resultados da Concentração Mínima Inibitória (MIC) acompanhados com a informação da sua interpretação (sensível, intermédio ou resistente).<sup>[18]</sup>

**Tabela XIV** - Cartas de Sensibilidade aos Antimicrobianos utilizados no VITEK® 2.<sup>[22]</sup>

Cartas de Sensibilidade
AST - 619: Carta utilizada para <i>Staphylococcus</i> spp
AST - 586: Carta utilizada para <i>Streptococcus</i> spp e <i>Enterococcus</i> spp
AST - 192: Carta utilizada para Enterobactérias
AST - 222: Carta utilizada para Não -Enterobactérias

## 2. Micologia

Os fungos emergiram como a causa principal de doenças infecciosas humanas, especialmente em indivíduos imunocomprometidos ou hospitalizados com graves doenças pré-existentes. Neste grupo de indivíduos, os fungos atuam como patógenos oportunistas, podendo causar situações de morbidade e mortalidade.<sup>[23]</sup> Deste modo, tal como as infeções provocadas por outro tipo de microrganismo, o diagnóstico de infeções fúngicas torna-se imprescindível. Os fungos podem ser unicelulares ou multicelulares denominados leveduras ou fungos filamentosos, respetivamente.<sup>[23]</sup>

### 2.1. EXAME MICROSCÓPICO

O exame microscópico direto constitui uma etapa importante no diagnóstico micológico por diversas razões, nomeadamente:

- Quando os agentes não podem ser submetidos ao exame cultural (ex. *Pneumocystis jiroveci*);
- Em situações de urgência a deteção imediata de elementos fúngicos pode fornecer informações de modo a orientar de imediato a terapêutica;

Pode ser realizado a fresco ou ser efetuado um esfregaço para corar pelo método de Gram.

### 2.2. EXAME CULTURAL

A Gelose de Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol 2 (SGC2) é o meio de cultura sólido eleito para a realização deste exame. As condições de incubação são diferentes das bactérias, uma vez que certas espécies de fungos patogénicos ou oportunistas desenvolvem-se mal a 37°C. Sendo assim, a Gelose SGC2 é colocada na estufa a 25°C <sup>[23]</sup> no máximo durante 7 dias. Diariamente são observados os exames culturais e efetuados os respetivos procedimentos (Tabela XV).

**Tabela XV** - Procedimentos a realizar consoante a observação do exame cultural para fungos.

<b>Ausência de crescimento após 24 horas de incubação</b>	Reincubação
<b>Ausência de crescimento após 7 dias de incubação</b>	Negativo
<b>Crescimento após 24 horas ou 7 dias</b>	Validação Médica

## 2.3. IDENTIFICAÇÃO

### 2.3.1. Pesquisa de Oocistos de *Pneumocystis jirovecii*

Embora anteriormente classificado como um parasita, evidências moleculares e genéticas classificaram *Pneumocystis jirovecii* um fungo. *Pneumocystis jirovecii* é um organismo que provoca infecção quase exclusivamente em pacientes debilitados e imunocomprometidos, sendo considerada a infecção oportunista mais comum em pacientes com SIDA.<sup>[25]</sup>

O laboratório utiliza a metodologia de Imunofluorescência Indireta (IFI) para a sua detecção em amostras de lavados brônquicos e broncoalveolares e secreções brônquicas.<sup>[25]</sup> A observação é efetuada no microscópio de fluorescência (ampliação de 400X) e o resultado é qualitativo.

### 2.3.2. Fungos Leveduriformes

A morfologia das leveduras não apresenta muita diversidade e, portanto, nem sempre é um parâmetro suficiente para a sua identificação. As leveduras crescem em 24-48h nos meios de isolamento sob a forma de colónias lisas, mais ou menos cremosas ou mucóides e a maioria de cor branca.<sup>[24]</sup>

#### 2.3.2.1. Exame microscópico

Ao microscópio ótico (ampliação 1000X - imersão) são observados elementos unicelulares, redondos ou ovais, com gemulação. Este aspeto morfológico permite apenas afirmar que se trata de uma levedura, não possibilitando determinar o género ou espécie.

#### 2.3.2.2. VITEK® MS

Este equipamento para além da identificação bacteriana permite a identificação de leveduras. Para além da colocação da matriz é adicionado ácido fórmico cujo papel é quebrar a parede celular da levedura.<sup>[7]</sup>

#### 2.3.2.3. VITEK® 2

Os fungos leveduriformes não são submetidos ao TSA, apenas a identificação se necessário. Como referido anteriormente, a Carta de Identificação para os fungos leveduriformes é a Carta YST.

### 2.3.3. Fungos Filamentosos

Quando ocorre o crescimento deste tipo de fungos, o técnico microbiologista não tem dificuldade em reconhecer. Apresentam um aspeto penugento associado ao desenvolvimento do micélio aéreo.<sup>[7]</sup> Estes fungos só são submetidos a identificação caso o médico responsável pelo paciente faça o pedido.

Critérios gerais de identificação de um fungo filamentoso <sup>[26]</sup>:

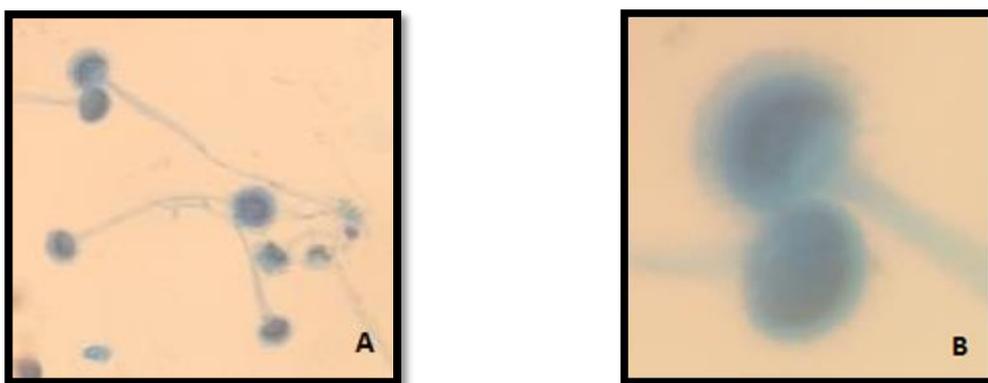
- Tempo de crescimento;
- Aspeto macroscópico das colónias;
- Presença ou ausência de septação das hifas;
- Modo de frutificação;
- Aspeto morfológico dos esporos.

#### 2.3.3.1. Técnica da Fita-Cola

Técnica efetuada pelo patologista clínico caso seja pedida a identificação do fungo filamentosos em questão.

O pedaço da cultura que é retirado pela fita-cola deve ser da zona periférica, uma vez que é onde apresenta um crescimento recente. É utilizado o azul de lactofenol para melhor distinguir as estruturas fúngicas ao microscópio (ampliação de 100X e 400X).<sup>[26]</sup>

Na Figura 2 está representado um dos fungos observados ao microscópio ótico, *Aspergillus flavus*.



**Figura 2** – Observação microscópica de *Aspergillus flavus*. A) ampliação 100X e B) ampliação 400X.

### 3. Micobacteriologia

As micobactérias apresentam-se como bacilos imóveis, aeróbios estritos, com um alto conteúdo genómico G+C e com capacidade de resistir à descoloração quando tratadas com álcool-ácido (denominadas de Bacilo-Álcool-Ácido-Resistente, BAAR). Esta resistência à ação decolorante do álcool-ácido está relacionada com a presença de ácidos micólicos na parede celular destas bactérias.<sup>[27]</sup>

A tuberculose é uma doença infecciosa que pode ser transmitida através de gotículas infetadas e os agentes etiológicos são BAAR pertencentes à família das *Mycobacteriaceae*.<sup>[27]</sup>

As amostras recebidas no laboratório com suspeita de conterem micobactérias podem ser aspirados gástricos, lavados brônquicos ou broncoalveolares, secreções brônquicas, líquidos pleurais, biópsias, urina, pús/exsudatos, fezes e hemoculturas.

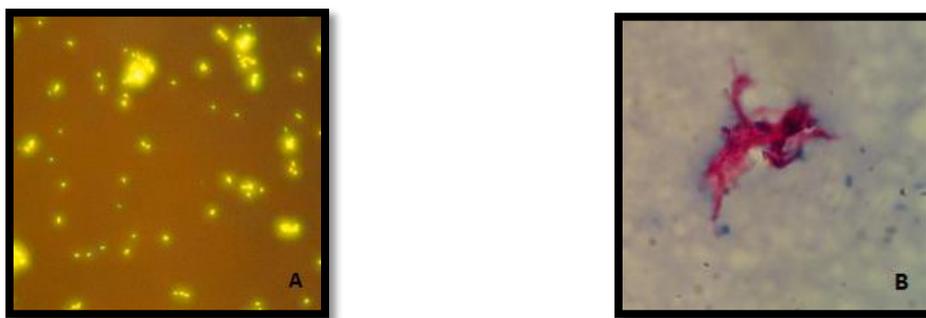
#### 3.1. MÉTODOS DE COLORAÇÃO

##### 3.1.1. Coloração por Auramina

Após o processo de descontaminação das amostras é efetuado o exame direto pela coloração por auramina. É uma técnica de fluorescência que permite a visualização dos BAAR como bacilos amarelo-fluorescentes quando observados em microscopia de fluorescência (Figura 3A).<sup>[27]</sup> Importa referir a quantidade de BAAR que se observa, a partir de valores tabelados, para melhor interpretação e validação dos resultados.

##### 3.1.2. Coloração de Kinyoun

Através da coloração de Kinyoun, os BAAR aparecem ao microscópio ótico corados de vermelho, devido à fucsina básica, num fundo azul (do corante azul-de-metileno) (Figura 3B). Se estiverem presentes outras bactérias, estas adquirem a cor do corante de fundo.<sup>[27]</sup> O laboratório utiliza esta técnica para confirmar exames diretos corados por auramina (positivos ou que suscitaram dúvida) e quando é pedido um exame direto da amostra antes desta ser descontaminada. Trata-se de um exame mais rápido, uma baciloscopia, que é usada para se saber se o doente está ou não bacilífero.



**Figura 3** – Observação microscópica de Bacilo-Álcool-Ácido-Resistente (BAAR): A) Coloração por Auramina; B) Coloração de Kinyoun.

## 3.2. PROCESSEAMENTO DAS AMOSTRAS

### 3.2.1. Digestão/ Descontaminação

As amostras são verificadas e caso o seu volume seja superior a 10ml são centrifugadas. Todas as amostras referidas, excetuando as hemoculturas, são sujeitas a um processo de descontaminação utilizando o kit BBL® MycoPrep™ de modo a reduzir ou eliminar a contaminação pela flora normal e maximizando a produção micobacteriana. A solução de N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sódio (NALC-NaOH) combina a ação mucolítica do NALC com a ação descontaminante do NaOH 2%. À mistura descontaminante é adicionada uma solução de tampão fosfato (pH 6,8) e o mesmo deve ser efetuado à resuspensão do concentrado após centrifugação (3000rpm/15min) para acerto do pH.<sup>[27]</sup>

### 3.2.2. Exame Cultural

O MGIT Mycobacteria Growth Indicator Tube contém de base Meio Líquido Middlebrook 7H9 modificado com um composto fluorescente dissolvido sensível à presença de oxigénio, BBL™ MGIT™ PANTA™ antibiotic mixture contendo uma mistura liofilizada de agentes antimicrobianos e BBL™ Middlebrook OADC Enrichment.<sup>[27]</sup>

A respiração ativa dos microrganismos consome o oxigénio e permite que a fluorescência seja detetada.<sup>[27]</sup>

Amostras de líquidos biológicos são inoculadas em meio de cultura sólido Löwenstein-Jensen (Tabela XVI).

**Tabela XVI** - Inoculação das amostras em meio Löwenstein-Jensen.

Meio de Cultura Löwenstein-Jensen	
Temperatura	Finalidade
25°C	Favorecer o crescimento de micobactérias atípicas
37°C	Temperatura ótima de crescimento das micobactérias

### 3.2.3. BACTEC™ MGIT™ 960

Equipamento no qual são introduzidos e incubados os tubos MGIT a 37°C e monitorizados a cada 60 minutos relativamente ao aumento de fluorescência.<sup>[27]</sup> A análise da fluorescência é utilizada para determinar se o tubo apresenta um resultado positivo no instrumento, isto é, se amostra testada contém organismos viáveis. Os frascos de cultura que se mantenham negativos durante um período mínimo de 42 dias (máximo 56 dias) e que não apresentem sinais visíveis de positividade são retirados do instrumento como sendo negativos.

Um resultado positivo é dado em Unidade Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL). Estes tubos identificados como positivos são sujeitos a uma preparação em lâmina para serem submetidas a coloração de Kinyoun.

### 3.3. IDENTIFICAÇÃO

Na observação dos BAAR ao microscópio ótico (ampliação de 1000X-imersão) é importante referir o aspeto característico (ex. cordas, aglomerados) para melhor orientar a sua identificação.

O Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) é composto pelas seguintes espécies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti* e *M. canetti*.<sup>[27]</sup> Estes são responsáveis pela morbidade e mortalidade no homem, sendo *M. tuberculosis* o agente patogénico mais frequentemente isolado do Complexo MTBC.

#### 3.3.1. AccuProbe® MYCOBACTERIUM TUBERCULOSE COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST

Esta metodologia consiste num teste rápido com uma sonda de DNA que utiliza a técnica de hibridação de ácidos nucleicos para a identificação de *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) isolado a partir da cultura.<sup>[27]</sup> Compreende 4 fases: (1) Lise e Extração de DNA; (2) Amplificação e Hibridação; (3) Seleção e (4) Deteção.

A hibridação de ácidos nucleicos é baseada na capacidade das cadeias complementares se alinharem especificamente e se associarem de maneira a formar um complexo estável em cadeia dupla.<sup>[28]</sup>

O sistema AccuProbe utiliza sondas de DNA para identificar o complexo *M. tuberculosis* (MTBC) com um marcador quimioluminescente complementar ao RNA ribossomal do organismo alvo.<sup>[28]</sup> Após o RNA ribossomal ser libertado do organismo, a sonda de DNA marcada hibridiza com o RNA ribossomal do organismo alvo e forma um híbrido estável DNA: RNA.

A diferenciação entre híbridos dos não-híbridos é feita através de um reagente de seleção. A leitura/deteção é efetuada num aparelho, luminómetro, que mede em função de Unidades Relativas de Luz. O cut-off definido é de 30 000 URL, e portanto um resultado positivo para MTBC ocorre quando a leitura é  $\geq 30\,000$  URL. Um valor abaixo deste cut-off ( $< 30\,000$  URL) indica um resultado negativo para MTBC.<sup>[29]</sup>

### 3.3.2. GenoType® *Mycobacterium*

Este teste utiliza tecnologia “DNA STRIP” (sondas em linha) baseada no processo de hibridação reversa dos produtos de PCR com sondas complementares, imobilizadas em linhas paralelas sobre uma membrana de nitrocelulose, sendo a sua deteção colorimétrica.

O seu procedimento completo envolve assim as fases: (1) Extração de DNA; (2) Amplificação; (3) Hibridação Reversa.<sup>[30]</sup>

A identificação das espécies que pertencem ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), de micobactérias clinicamente mais relevantes (CM) e de micobactérias não tuberculosas (AS) é realizada por este teste de genética molecular.

#### a) GenoType MTBC

Este teste permite a diferenciação rápida e segura dos membros do complexo MTBC (Figura 4A). O laboratório realiza este teste em amostras de crianças com suspeita da doença causada por *M. bovis* (vacinação de BCG), pacientes com suspeita de tuberculose óssea (*M. bovis*) e doentes sob terapia intravesicular com BCG.

#### b) GenoType *Mycobacterium* CM/AS

Permite a identificação ao nível da espécie das micobactérias atípicas mais comuns (Common *Mycobacteria*, CM): *M. avium* spp., *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M.*

*scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, o complexo *M. tuberculosis* e *M. xenopi* (Figura 4B).<sup>[31]</sup>

As micobactérias não tuberculosas (“additional species”, AS) podem causar micobacterioses crónicas dependendo do estado imunitário da pessoa afetada. A partir do meio de cultura, este teste *in vitro* permite qualitativamente identificar as espécies pertencentes a este grupo: *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgail*/*M. intermedium*, *M. phlei*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M. asiaticum* e *M. shimoidei* (Figura 4B).<sup>[31]</sup>

De forma a validar o desempenho correto do teste e o funcionamento apropriado dos componentes do kit, cada tira inclui zonas de controlo: Controlo do Conjugado (CC), confere a ligação do conjugado na tira e uma reação cromogénea correta; Controlo Universal (UC), deteta todas as micobactérias e membros do grupo das bactérias Gram-positivo com conteúdo alto em G+C; Controlo do Género (GC), confirma a presença de um membro do género *Mycobacterium* (Figura 4). Depois de incubadas, as tiras são colocadas sob a ficha de avaliação correspondente e alinhadas com o esquema. A cada espécie ou conjunto de espécies corresponde um padrão de bandas de hibridação específico que permite a identificação desejada (ANEXO I).



**Figura 4** - GenoType *Mycobacterium*: A) Complexo *M. tuberculosis*, MTBC e B) Common Mycobacteria/Additional Species, CM/AS.

### 3.4. ANTIBIOGRAMA

O teste de sensibilidade a antimicobacterianos é importante para o tratamento adequado de doentes com tuberculose. O tratamento da tuberculose faz-se habitualmente recorrendo a um regime farmacológico múltiplo que inclui os fármacos Estreptomicina (STR), Isoniazida (INH), Rifampicina (RIF), Etambutol (EBM) e Pirazinamida (PZA). É importante que os fármacos

antimicobacterianos prescritos demonstrem uma atividade apropriada contra o *M. tuberculosis*, ou seja, que exista sensibilidade do isolado ao fármaco.<sup>[28]</sup>

São utilizados os Kits BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE, (inclui os fármacos Estreptomicina, Isoniazida, Rifamicina e Etambutol) e BACTEC™ MGIT™ 960 PZA (contém o fármaco Pirazinamida) para a realização do antibiograma. A Pirazinamida não se encontra no mesmo Kit que os restantes fármacos porque requer alterações na metodologia laboratorial, uma vez que este fármaco é ativo *in vitro* apenas em meio ácido.<sup>[32]</sup> O teste é baseado no crescimento de isolados de *M. tuberculosis* num tubo contendo fármaco, que é comparado com um tubo isento de fármaco (Controlo do Crescimento). O instrumento monitoriza os tubos relativamente a uma diminuição de oxigénio. A análise da fluorescência no tubo contendo fármaco, comparativamente com a fluorescência presente no tubo Controlo de Crescimento, é usada pelo instrumento para determinar os resultados da sensibilidade. O aparelho BACTEC MGIT interpreta estes resultados automaticamente e reporta um resultado como sensível ou resistente.

## 4. Parasitologia

As doenças parasitárias raramente provocam manifestações clínicas específicas, o que dificulta o seu diagnóstico. Assim, o clínico deve considerar esta premissa e basear-se noutras informações como detalhes de viagens realizadas, tipo de alimentação, água consumida, entre outros.<sup>[33]</sup> A colheita da amostra, o número de amostras e o tempo de transporte para o laboratório são fatores que devem ser efetuados adequadamente, uma vez que qualquer condição que possa distorcer a aparência morfológica dos parasitas pode levar a uma má identificação e diagnóstico errado.

### 4.1. AMOSTRAS BIOLÓGICAS

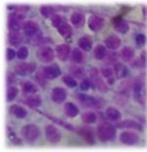
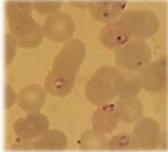
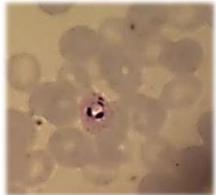
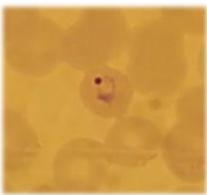
#### 4.1.1. Sangue

A deteção e identificação de agentes parasitários no sangue é fundamental na aplicação adequada do tratamento.

##### 4.1.1.1. Esfregaço Sangue Periférico

A análise parasitológica em amostras de sangue é efetuada em sangue total com anticoagulante e é necessário a realização de um esfregaço numa lâmina seguido de uma coloração May Grünwald Giemsa. O esfregaço de sangue periférico é observado ao microscópio ótico (ampliação 1000X- imersão) de forma a detetar a presença ou ausência de agentes parasitários, identificação das espécies, grau de parasitémia e as várias formas do parasita (Tabela XVII).

**Tabela XVII** – Observação microscópica de parasitas sanguíneos.

<i>Trypanosoma brucei</i> (Tripomastigota)	<i>Leishmania</i> spp (Amastigota)	<i>Plasmodium falciparum</i> (Trofozoítos)	<i>Plasmodium falciparum</i> (Gametócito)
			
<i>Plasmodium ovale</i>	<i>Plasmodium vivax</i>	<i>Plasmodium malariae</i>	<i>Loa Loa</i>
			

#### 4.1.1.2. Teste Imunocromatográfico BinaxNOW®

A malária é uma das mais importantes doenças parasitárias e o seu diagnóstico é realizado em sangue total com anticoagulante através de métodos microscópicos tradicionais, como o esfregaço de sangue periférico, e complementado com testes imunocromatográficos. O teste BinaxNOW® é baseado num ensaio imunocromatográfico que permite a deteção qualitativa dos antígenos de *Plasmodium* utilizando anticorpos monoclonais. O teste deteta a proteína II rica em histidina (HRPII), específica de *P. falciparum*, e um antígeno Pan-malárico, comum a todas as quatro espécies com capacidade para infetar o homem (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*).<sup>[33]</sup>

Os resultados do teste são interpretados pela presença ou ausência de linhas visualmente detetáveis de cor rosa a violeta após 15 minutos. Um resultado positivo inclui a deteção de uma Linha(s) de Teste(s) e de uma Linha Controlo. Um resultado negativo produzirá apenas uma Linha Controlo, o que indica que os antígenos da malária não foram detetados na amostra.

#### 4.1.2. Fezes

Neste tipo de amostras é obrigatório a colheita de amostras repetidas em dias diferentes (3 amostras em dias alternados) de modo a otimizar a deteção dos organismos que são eliminados de forma intermitente.<sup>[33]</sup>

O procedimento laboratorial deste tipo de amostras encontra-se descrito na tabela XVIII.

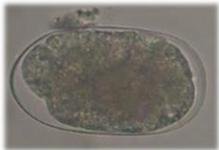
**Tabela XVIII** - Processamento laboratorial das amostras fecais para exame parasitológico.

<b>Exame Macroscópico</b>	Observação e registo quanto à consistência e presença de sangue, muco e/ou organismos	
<b>Exame Microscópico Direto</b>	A Fresco	Método de Sedimentação - Concentração
	Após coloração	Coloração Kinyoun

##### a) Método de Sedimentação – Concentração

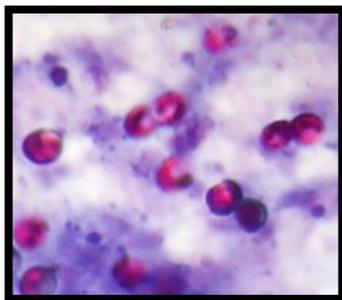
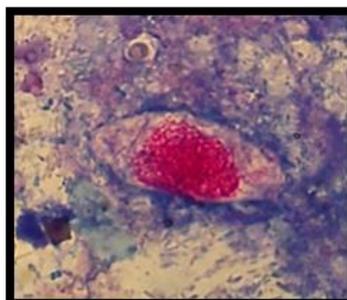
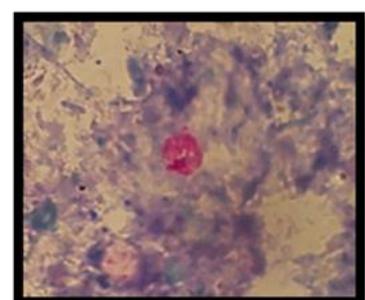
Técnica recomendada para pesquisa de cistos, ovos e larvas em amostras de fezes.<sup>[33]</sup> Utiliza formol como conservante e éter como solubilizante de gorduras e fibras que possam estar presentes. A centrifugação permite a obtenção de camadas diferenciadas e o sedimento é observado ao microscópio (entre lâmina e lamela) de modo a detetar a presença de parasitas (Tabela XIX).

**Tabela XIX** - Parasitas intestinais observados após o Método de Sedimentação-Concentração.

<i>Entamoeba coli</i> (Quistos)	<i>Ascaris lumbricoides</i> (Ovo fértil)	<i>Ascaris lumbricoides</i> (Ovo Infértil)	<i>Taenia</i> spp (Ovo)
			
<i>Trichuris trichiura</i> (Ovo)	<i>Cystoisospora belli</i> (Oocisto maduro)	<i>Diphyllobotrium latum</i>	Hookworm
			

## b) Coloração de Kinyoun

Para ser possível a detecção de determinados microrganismos é necessário a realização desta técnica de coloração. Esta coloração é efetuada quando o clínico suspeita de infecções parasitárias por *Cryptosporidium* spp, *Cystoisospora belli* e *Cyclospora cayetanensis* (Fig. 5, 6 e 7, respetivamente).

**Figura 5** - Oocistos de *Cryptosporidium* spp**Figura 6** - Oocisto de *Cystoisospora belli***Figura 7** - Oocisto de *Cyclospora cayetanensis*

## 5. Virologia

Os vírus são microrganismos intracelulares obrigatórios, porque necessitam de infectar células vivas para se conseguirem replicar.<sup>[34]</sup> O diagnóstico virológico é fundamental no reconhecimento das infecções virais e para a aplicação da terapêutica e das medidas de prevenção necessárias.

A metodologia adotada pelo laboratório é a Imunofluorescência (IF) e dependendo do vírus a detetar, a IF pode ser realizada por Imunofluorescência Direta (IFD) ou por Imunofluorescência Indireta (IFI).

### 5.1. Pesquisa Antigénica de Vírus Respiratórios

Metapneumovírus humano (hMPV), Adenovírus, Vírus respiratório sincicial (VRS), Parainfluenzavírus 1, 2, 3 (PIV) e Influenzavírus A e B são os vírus responsáveis por infecções respiratórias frequentes, que podem ser graves nas crianças, nos idosos e em doentes imunodeprimidos. A metodologia utilizada para deteção destes vírus é por Imunofluorescência Direta (IFD).<sup>[34]</sup>

O tipo de amostras recebidas no laboratório para a deteção dos antígenos virais são secreções brônquicas, aspirados nasofaríngeos, lavados brônquicos e broncoalveolares, aspirados pulmonares e líquidos pleurais.

#### Processamento das amostras

As amostras já referidas para a pesquisa antigénica de vírus respiratórios devem ser diluídas em PBS. Muitas vezes, estas amostras são mucóides, como por exemplo secreções brônquicas, e por conseguinte demasiado espessas o que torna necessário a adição de N-acetil-L-cisteína (NALC), um agente com capacidade fluidificante. Após centrifugação (3000rpm/10min) e rejeitado o sobrenadante, a amostra é novamente suspensa até ser obtida uma solução homogénea. A amostra tratada é colocada em poços da lâmina que, depois de seca (estufa a 37°C), é fixada em acetona.

As amostras depois de processadas podem ser sujeitas à realização de um *screening* para a pesquisa de todos os vírus respiratórios referidos e, no caso de o *screening* ser positivo avança-se para a pesquisa destes individualmente ou podem ser imediatamente direcionados para a realização do painel.

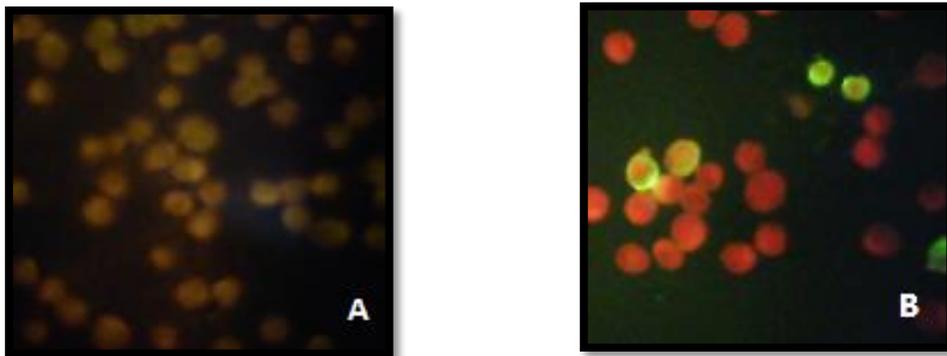
Para serem detetados os antígenos virais, em cada poço é colocada uma gota de cada anticorpo monoclonal a testar (Figura 8).



**Figura 8-** Lâmina referente ao painel dos vírus respiratórios. 1) Adenovírus; 2) Vírus Influenza A; 3) Vírus Influenza B; 4) PIV 1; 5) PIV 2; 7) PIV 3; 9) hMPV; 11) VRS

### Observação e interpretação dos resultados

A lâmina é visualizada ao microscópio de fluorescência (ampliação de 400X). O resultado é dado qualitativamente, sendo negativo (Figura 9A) ou positivo no caso das células infectadas pelos vírus respiratórios fixarem o anticorpo monoclonal e surgirem fluorescentes sob a luz ultravioleta (Figura 9B).



**Figura 9-** Observação do poço controle para Adenovírus. A) Controle Negativo; B) Controle Positivo.

### **5.2. Pesquisa Antigénica de Citomegalovírus**

O Citomegalovírus (CMV) é um agente patogénico humano comum que estabelece infeções latentes.<sup>[35]</sup> Num indivíduo imunocompetente estas infeções são geralmente assintomáticas, enquanto num indivíduo imunodeprimido o CMV é considerado um agente infeccioso oportunista. Este vírus pode estar presente na urina, sangue, lavados, saliva, lágrimas, leite materno, sémen, líquido amniótico e secreções cervicovaginais.<sup>[34]</sup>

As amostras enviadas para o laboratório para a pesquisa de CMV são sangue total com anticoagulante e amostras do trato respiratório (apenas lavados brônquicos ou broncoalveolares) que são preparadas e processadas para a realização da técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI). Em sangue total, o teste permite detetar a fosfoproteína da

matriz interna (pp65) em leucócitos do sangue periférico, permitindo o diagnóstico de infecções agudas.<sup>[34]</sup>

#### Processamento das amostras

O processamento das amostras do trato respiratório para a pesquisa de CMV é efetuado de forma semelhante ao dos vírus respiratórios, apenas difere no momento da coloração uma vez que para detecção dos antígenos virais do CMV é utilizada a técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI). Na amostra de sangue total, o fundamental são os leucócitos e, para os obter é utilizada uma solução de dextrano que permite que a sua separação. A contagem da suspensão celular é realizada no equipamento Sysmex XE-2100D™ ou no Sysmex XE-5000™, sendo feitas as diluições necessárias para obter uma contagem de aproximadamente 2000 células/ $\mu$ l ou proceder-se à concentração da amostra caso for obtido um número inferior.

#### Observação e interpretação dos resultados

A observação é realizada ao microscópio de fluorescência (ampliação 400x) e para a amostra de sangue total são contadas as células positivas ao longo de todo o poço, sendo o resultado semi-quantitativo (número de células positivas/2000 WBC/ $\mu$ l).

Nas amostras do trato respiratório o resultado é qualitativo, porque apenas é verificada a existência de células para a sua valorização.

### **5.3. Pesquisa Antigénica de Adenovírus e Rotavírus**

O Rotavírus (serotipo A) é considerado a causa mais comum de gastroenterite aguda em crianças, podendo levar à sua hospitalização em casos de diarreia severa.<sup>[36]</sup>

O Adenovírus para além de estar associado a infeções respiratórias, constitui uma importante causa de gastroenterite viral aguda e são os adenovírus entéricos dos serotipos 40 e 41 que parecem ser os responsáveis por gastroenterites na população pediátrica.<sup>[37]</sup>

O diagnóstico de uma gastroenterite viral torna-se essencial uma vez que permite reduzir a utilização de antibióticos. Na prática clínica começaram a ser amplamente usados testes de deteção rápida do antígeno viral.<sup>[37]</sup> No laboratório é utilizado o kit Combi-Strip®, um teste imunocromatográfico baseado numa membrana de nitrocelulose sensibilizada com os anticorpos monoclonais direcionados contra os vírus em questão e com anticorpo policlonal anti-IgG na zona de controlo. São desenvolvidas linhas vermelhas conforme a formação dos complexos antígeno-conjugado formados à medida que a solução migra.<sup>[38]</sup>

### Processamento das amostras

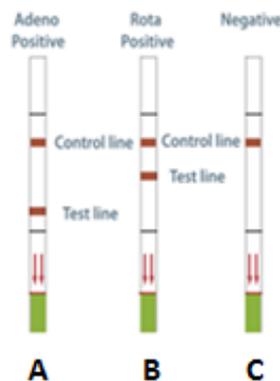
As amostras fecais são diluídas num tampão fornecido pelo kit e após a sua homogeneização a tira de teste é imersa na solução e deixada a incubar (10 min).

### Observação e interpretação dos resultados

A observação e leitura da tira de teste são efetuadas após 10 minutos e podem ocorrer os seguintes resultados:

- Positivo para Adenovírus, são desenvolvidas a primeira linha de teste e a linha de controlo (Figura 10A);
- Positivo para Rotavírus, são desenvolvidas a segunda linha de teste e a linha de controlo (Figura 10B);
- Negativo, as linhas de teste para Adenovírus e Rotavírus não são desenvolvidas mas a linha do controlo aparece, confirmando a funcionamento do teste (Figura 10C).

O teste é considerado inválido caso não a linha de controlo não seja desenvolvida.



**Figura 10** - Pesquisa antigénica de Adenovírus e Rotavírus.<sup>[38]</sup>

## **IV. HEMATOLOGIA LABORATORIAL**

---

A Hematologia é definida como o estudo da formação e morfologia das células sanguíneas e das suas funções fisiológicas, assim como das funções dos órgãos hematopoiéticos e as doenças a eles relacionados.<sup>[39]</sup> Este setor encontra-se bastante automatizado, no entanto, o estágio permitiu-me integrar a rotina normal do setor: programar os equipamentos; programar, aplicar e interpretar o controlo de qualidade; preparar e corar pelos diferentes métodos de coloração os esfregaços de sangue periférico; e interpretar alguns resultados.

### **Sangue**

O sangue constitui um dos mais complexos sistemas do corpo humano, sendo o responsável pelo fornecimento de oxigénio e nutrientes aos tecidos, pelo transporte dos produtos residuais aos pulmões, fígado e rins para serem eliminados e auxilia a defesa do organismo. No adulto, a porção celular deste fluido representa 45% do volume de sangue e é constituído por eritrócitos, leucócitos e plaquetas, sendo denominada hematócrito. Os eritrócitos (RBC) transportam o oxigénio através da hemoglobina, os leucócitos (WBC) são responsáveis pela defesa do organismo contra substâncias estranhas e as plaquetas (PLT) têm como principal função o controlo das hemorragias, intervindo no processo de coagulação. Os restantes 55% constituem a porção fluída ou plasma (90% água e 10% proteínas, glícidos, vitaminas, hormonas, enzimas, lípidos e sais minerais).<sup>[40]</sup>

### **Líquidos Biológicos**

Os diversos fluidos corporais (LCR, pleural, ascítico, peritoneal, pericárdico e sinovial), também podem ser recebidos no laboratório para realização da contagem e diferenciação celular, constituindo um aspeto importante para um diagnóstico correto. São vários os motivos clínicos para requerer esta análise, sendo a maior parte dependendo do tipo de fluido corporal.

### **Processamento das amostras**

As amostras que chegam ao laboratório devem encontrar-se devidamente identificadas. Após triagem e homogeneização são colocadas nos respetivos analisadores hematológicos. Os resultados de cada análise são integrados no sistema informático e podem ser validados automaticamente pelo sistema ou pelo clínico hematologista. Depois de efetuadas todas as análises requeridas e validadas, as amostras são arquivadas pelo equipamento TS-500,

permitindo a sua consulta sempre que necessário. Caso exista algum pedido de análise pendente este equipamento coloca essas amostras no suporte do respetivo erro.

## I. Hemograma

Hemograma constitui um dos exames complementares de diagnósticos mais requisitados, uma vez que avalia quantitativa e qualitativamente os elementos celulares do sangue (eritrócitos, leucócitos e plaquetas).<sup>[41]</sup> Os resultados superiores ou inferiores aos valores de referência (ANEXO II) são alvo de validação por parte do clínico hematologista. Este exame é fundamental para o estudo da função hematológica, no entanto, dependendo do seu resultado e do estado clínico do doente, pode ser necessária uma análise mais cuidada dos elementos celulares, como o estudo morfológico através da análise do esfregaço sanguíneo.

### Equipamentos

No laboratório são utilizados analisadores hematológicos automáticos que usam diversas tecnologias para determinar os parâmetros de um hemograma completo possibilitando um diagnóstico laboratorial. Os equipamentos possuem sistemas gráficos de distribuição de resultados, alertas de processamento e permitem a análise da amostra em modo automático, modo manual e em modo capilar (amostras com volume reduzido).

- Sysmex® XE-2100D™

As amostras são analisadas neste equipamento em modo “Sampler”, isto é, automaticamente num modo fechado em que não é necessária a remoção das tampas.

Este analisador processa amostras de sangue venoso com EDTA e possibilita uma análise fiável de uma amostra em aproximadamente 60 segundos e são determinados até 24 parâmetros de análise e 2 parâmetros de pesquisa (ANEXO III).<sup>[42]</sup>

Na Tabela XX encontram-se os parâmetros gerais de análise e as respetivas metodologias.

**Tabela XX** - Parâmetros de análise do Sysmex® XE-2100D™ e respetivas metodologias.<sup>[42;43]</sup>

Parâmetros	Metodologia
Eritrócitos Plaquetas	Medição da Impedância com focagem hidrodinâmica
Concentração da Hemoglobina	Método de deteção de Hemoglobina SLS
Leucócitos Basófilos	Citometria de Fluxo

▪ Sysmex® XE-5000™

Comparativamente ao Sysmex® XE-2100D, este permite medir um maior número de parâmetros: 37 parâmetros de diagnóstico, 6 dedicados aos fluídos corporais (ANEXO IV). Neste equipamento são processadas amostras de sangue venoso com EDTA e fluídos corporais. As amostras de sangue em tubo de hemograma de tamanho normal são analisadas automaticamente. A análise de amostras pediátricas (tubo pequeno) e dos líquidos biológicos é efetuada em modo manual aberto através de uma pipeta de aspiração.

Como referido anteriormente, para além dos parâmetros de rotina este equipamento permite determinar outros parâmetros sanguíneos, pelas respetivas metodologias (Tabela XXI), que são clinicamente relevantes.<sup>[44;45]</sup>

- Contagem de granulócitos imaturos (IG): metamielócitos, mielócitos e promielócitos;
- Contagem de eritrócitos nucleados (NRBC), importante para uma correta e precisa contagem de leucócitos (WBC) e diferencial leucocitário (Diff);
- Contagem plaquetas óticas (PLT-O);
- Contagem de Reticulócitos (RET);

**Tabela XXI** - Parâmetros de análise do Sysmex® XE-5000™ e respetivas metodologias.<sup>[43;45]</sup>

Parâmetro	Metodologia
WBC NRBC RET PLT-O	Citometria de Fluxo por Fluorescência
RBC PLT	Medição da Impedância com focagem hidrodinâmica
HGB	Método de deteção de Hemoglobina SLS
IG	Método de deteção RF/DC
	Citometria de Fluxo por Fluorescência

## Metodologias

### Medição da Impedância

A contagem de impedância, descrita por Wallace Coulter, é fundamentada na detecção e medição da resistência elétrica produzida pelas células quando passam por pequenas aberturas. Este é o fundamento da impedância, também denominada de resistência isovolumétrica. A amostra diluída ao atravessar um campo elétrico com intensidade de corrente constante entre os eletrodos vai provocar uma alteração do potencial elétrico, levando ao aumento da tensão entre os eletrodos, que é proporcional ao volume de células.<sup>[43;46]</sup>

### Focagem Hidrodinâmica

Para a determinação da impedância ser o mais correta possível é utilizada a Focagem Hidrodinâmica que melhora a exatidão, reprodutibilidade e a linearidade da contagem de células sanguíneas ao direcionar as células para o centro da abertura da célula de fluxo onde vão ser medidos os impulsos elétricos. Problemas como o fenômeno de coincidência (passagem simultânea de várias células pela abertura são contabilizadas como uma única célula) e a produção de impulsos anormais (recirculação das células) são minimizados pelo uso desta tecnologia.<sup>[43;46]</sup>

### Citometria de Fluxo

Técnica que permite analisar as características físicas e químicas das células sanguíneas (tamanho e complexidade celular) à medida que passam por pequenas e sensíveis zonas de detecção.<sup>[44]</sup> As células sanguíneas são atingidas por um feixe de laser semiconductor que provoca a separação das mesmas devido à dispersão da luz em três sinais diferentes:

- “Forward Scatter” ou Dispersão de luz frontal – Informa sobre tamanho das células;
- “Side Scatter” ou Dispersão de luz lateral – Informa sobre a complexidade celular;
- “Side Fluorescence” ou Fluorescência Lateral - Informa a quantidade de DNA e RNA presente nas células. Quando esta fluorescência é utilizada o método denomina-se Citometria de Fluxo por Fluorescência.

A combinação destas informações permite agrupar as células com propriedades físicas e químicas semelhantes em cinco populações: linfócitos, monócitos, basófilos, eosinófilos e

neutrófilos. Sendo esta luz convertida em impulsos elétricos é possível a obtenção de análises detalhadas em diagramas de dispersão ou histogramas (ANEXO V).<sup>[43;47]</sup>

#### Método de Detecção RF/DC

Este método é responsável por detetar o tamanho das células sanguíneas e a estrutura interna celular através de alterações na corrente de radiofrequência (RF) e na corrente direta (DC) respetivamente.<sup>[44]</sup> As células sanguíneas em suspensão expostas a essas correntes, provocam alterações das resistências que se traduzem na alteração do potencial entre os elétrodos e, conseqüentemente a geração de impulsos elétricos. Com base no tamanho destes impulsos são obtidos diagramas de dispersão contendo a informação pretendida.<sup>[43;47]</sup>

#### Método de Detecção de Hemoglobina SLS

Para a determinação da concentração de hemoglobina este método utiliza o composto químico Lauril Sulfato de Sódio (SLS), livre de cianeto. Este possui afinidade para a meta-hemoglobina que é formada após a lise dos eritrócitos. A absorvância do complexo colorido formado a 536 nm é proporcional à concentração de hemoglobina.<sup>[48;49]</sup>

### I.1. ERITROGRAMA

#### **Contagem de eritrócitos (RBC)**

A contagem de eritrócitos diz respeito ao número total de eritrócitos existentes na amostra de sangue, expressos normalmente em número de células por litro. Valores inferiores ao intervalo de referência significam geralmente uma situação de anemia em conjunto com a diminuição da hemoglobina e do hematócrito.<sup>[50]</sup>

#### **Hematócrito (HCT)**

Este parâmetro corresponde ao volume ocupado pelos eritrócitos em relação ao volume total de sangue, expresso em Litro/Litro. Os equipamentos calculam-no utilizando os valores obtidos de MCV (volume corpuscular médio dos eritrócitos) e da contagem de RBC:

$$\text{HCT (l/l)} = \text{MCV (fL)} \times \text{RBC (x } 10^{12} / \text{l)}$$

A anemia é a situação mais comum que explica um reduzido valor de hematócrito, enquanto valores elevados podem ser resultado de policitemia.<sup>[51]</sup>

## Hemoglobina (HGB)

A hemoglobina é o principal componente dos eritrócitos e é a proteína que liga oxigênio e dióxido de carbono e os transporta ao longo do organismo. Como referido anteriormente, uma redução no valor da concentração da hemoglobina associado a outros parâmetros é indicativo de uma situação de anemia.<sup>[51]</sup>

## Índices Eritrocitários

Os índices eritrocitários, quer sejam calculados através dos parâmetros referidos anteriormente quer sejam determinados automaticamente, têm uma elevada importância e utilidade na caracterização morfológica das anemias.<sup>[51]</sup>

### Volume Corpuscular Médio (MCV)

O volume corpuscular médio, expresso em fentolitros, é medido diretamente pelos auto-analisadores. É o parâmetro que informa acerca do tamanho médio dos eritrócitos e permite compreender situações de anemia caracterizadas pelos valores aumentados (anemia macrocítica), reduzidos (anemia microcítica) ou normais de MCV (anemia normocítica).<sup>[41;52]</sup>

### Hemoglobina Corpuscular Média (MCH)

A hemoglobina corpuscular média, expressa em picogramas, indica o valor médio de hemoglobina por eritrócito.<sup>[51]</sup>

$$\text{MCH (pg)} = \frac{\text{HGB (g/dL)}}{\text{RBC (x } 10^{12}/\text{l)}}$$

Existe alguma tendência para caracterizar situações de anemia a nível da quantidade de hemoglobina presente nos eritrócitos (hiper, hipo ou normocrómicas) apenas tendo em consideração esta determinação, mas para classificar esses tipos de anemias é necessário interpretar conjuntamente os valores obtidos do MCV e MCHC.<sup>[53]</sup>

### Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (MCHC)

A concentração da hemoglobina corpuscular média corresponde à concentração média de hemoglobina num determinado volume de eritrócitos (100 ml), calculado a partir da hemoglobina corpuscular média (MHC) e do valor de hematócrito [51]:

$$\text{MCHC (g/dL)} = \frac{\text{MHC}}{\text{HCT}} \times 100$$

### **Amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW)**

RDW é definido como o coeficiente de variação dos eritrócitos baseado na distribuição do seu volume. Pode ser expresso como desvio padrão (SD) em fentolitros ou como coeficiente de variação (CV) em percentagem [44;52]:

$$\text{RDW SD (fL)} = \text{Largura do histograma de distribuição ao nível de frequência de 20\% *}$$

\*altura do pico considerada como sendo 100%

$$\text{RDW CV (\%)} = \frac{\text{SD}}{\text{MCV}} \times 100$$

A Anisocitose é uma situação comum em distúrbios hematológicos e é caracterizada por um aumento do RDW. Pode ser resultado da presença de eritrócitos maiores que o normal (macrocitose), eritrócitos mais pequenos (microcitose) ou ambos os casos. [54]

#### **I.I.I. Anemia**

A anemia é um distúrbio hematológico comum e é definido pela diminuição do nível de hemoglobina, abaixo dos valores de referência normais para a idade e sexo, alterando a capacidade de transporte de oxigénio pelo sangue. Um ótimo indicador de anemia é o reduzido número de RBC. A contagem de reticulócitos, a morfologia dos eritrócitos e a presença ou ausência de alterações a nível dos leucócitos e plaquetas também auxiliam no diagnóstico causal da anemia. [50;55]

No serviço de Patologia Clínica do CHS], o diagnóstico laboratorial e diferencial das anemias com a determinação de parâmetros especializados para o efeito é efetuado num setor diferente, o qual não houve oportunidade de estar presente.

As anemias podem ser classificadas de acordo com o tamanho dos eritrócitos em microcíticas, normocítica e macrocíticas pela determinação do MCV e as suas causas mais comuns encontram-se descritas na Tabela XXII.

### Anemia Microcítica Hipocrômica

A deficiência de ferro é a causa predominante de anemia microcítica hipocrômica, na qual o MCV e a MCH estão diminuídos e a observação microscópica do esfregaço de sangue apresenta eritrócitos pequenos (microcíticos) e pálidos (hipocrômicos).<sup>[50]</sup> Este tipo de anemia inclui: Anemia por Deficiência de ferro, Anemia da Doença Crónica, Anemia Sideroblástica congénita e algumas hemoglobinopatias como as Talassemias.

- Anemia por Deficiência de ferro

Existência de uma deficiência primária de ferro disponível para os glóbulos vermelhos. A perda de sangue, uma dieta deficitária, má absorção, e gravidez podem ser causas para este tipo de anemia.<sup>[55]</sup>

- Anemia da Doença Crónica

Utilização ou metabolismo deficiente do ferro que está associada a distúrbios não hematológicos crónicos, como infeções crónicas, doenças do tecido conjuntivo, doenças malignas, patologias a nível renais, da tiróide e da hipófise.<sup>[54]</sup>

- Anemia Sideroblástica Congénita

Anemia definida pela presença de sideroblastos patológicos, sideroblastos em anel, na medula óssea.<sup>[50]</sup> A coloração de Perls é responsável pela deteção dos grânulos sideróticos nos NRBC presentes na medula e quando circulam no sangue periférico.<sup>[56]</sup>

- Talassemias

Constituem um grupo heterogéneo de doenças genéticas que resultam da diminuição da velocidade de síntese das cadeias globínicas  $\alpha$  ou  $\beta$ , denominando-se de  $\alpha$ -talassemia e  $\beta$ -talassemia, respetivamente. Como resultado, existe um défice global de hemoglobina (HBG) nos eritrócitos e o MCV e MCH estão reduzidos.<sup>[50;55]</sup>

### Anemia Normocítica e Normocrômica

O hemograma apresenta valores de MCV e MCHC normais. A ocorrência de hemorragias agudas, anemia hemolítica, hipoplasia da medula, patologia renal e anemia inicial por deficiência de ferro constituem as causas mais frequentes de anemia normocítica.<sup>[55]</sup>

- Anemia Hemolítica

A hemólise é definida como a destruição da membrana do eritrócito, provocando a liberação da hemoglobina (HGB). São várias as causas que levam ao aumento da destruição dos eritrócitos, como são exemplo os defeitos da membrana (esferocitose hereditária), defeitos enzimáticos, hemoglobinopatias, destruição autoimune, etc. Este tipo de anemia é quase sempre acompanhado por um aumento da contagem de reticulócitos e evidências morfológicas relativamente aos eritrócitos.<sup>[55]</sup>

- Anemia Aplástica

Anemia caracterizada por uma hipoproliferação que afeta todos os elementos celulares periféricos (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) pela depleção dos precursores hematopoiéticos. Pode ser herdada ou adquirida devido a toxinas, infecções, radiação ou disfunção imune.<sup>[55]</sup>

- Anemia devido a insuficiência renal

A função excretora do rim é perdida e resulta num aparecimento de ureia na urina (urémia) que é responsável pela alteração morfológica dos eritrócitos. A capacidade de produção de eritropoietina também é afetada, resultando numa eritropoiese ineficaz.<sup>[55]</sup>

### Anemia Macroscítica

As anemias macroscíticas podem ser diagnosticadas no hemograma através da baixa contagem de RBC e um alto valor de MCV. A causa mais comum deste tipo de anemia reside na deficiência nutricional de Vitamina B<sub>12</sub> e Ácido fólico. Estes são necessários para a síntese do DNA e a sua insuficiência interfere na sincronização da maturação citoplasma /núcleo.<sup>[55]</sup>

- Anemia Megaloblástica

A medula é megaloblástica se possuir alterações das características dos precursores de eritrócitos e leucócitos. Morfológicamente, o citoplasma está maduro enquanto o núcleo

permanece imaturo. É frequente a produção de neutrófilos hipersegmentados e grandes e eritrócitos de forma oval.<sup>[55;57]</sup>

- Anemia Não-Megaloblástica

Anemia associada a patologias do fígado, excesso do consumo de álcool e hipotireoidismo. Difere da anterior por não apresentar os macroovalócitos característicos e os neutrófilos hipersegmentados e gigantes.<sup>[57]</sup>

**Tabela XXII** - Causas mais frequentes das anemias microcíticas, normocíticas e macrocíticas.<sup>[40]</sup>

ANEMIA	CAUSAS
<b>Microcítica</b>	Anemia por Deficiência de ferro
	Anemia da Doença Crónica
	Anemia Sideroblástica congénita
	Talassemia
<b>Normocítica</b>	Início de Anemia por Deficiência de ferro
	Início de Anemia da Doença Crónica
	Perda de sangue recente
	Deficiência combinada de ferro e ácido fólico ou Vitamina B <sub>12</sub>
	Falência renal
	Anemia Hemolítica
<b>Macrocítica</b>	Deficiência de Vitamina B <sub>12</sub>
	Deficiência de Ácido Fólico
	Administração de fármacos
	Patologia hepática
	Excesso de álcool
	Hipotireoidismo
	Anemia Hemolítica
	Síndrome Mielodisplásico

## 1.2. LEUCOGRAMA

Os leucócitos são os responsáveis pela defesa do organismo e a sua análise num hemograma tem como objetivo principal a obtenção da contagem total de leucócitos, a determinação da fórmula leucocitária com quantificação e avaliação morfológica dos diversos tipos.<sup>[41]</sup>

A contagem total engloba os granulócitos ou leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, basófilos e eosinófilos) e os leucócitos mononucleares (linfócitos e monócitos).

Um aumento acima dos valores de referência nesta contagem é denominada de leucocitose, podendo envolver qualquer um destes glóbulos brancos. É designada neutrofilia, eosinofilia, basofilia, monocitose e linfocitose quando apenas um tipo de célula se encontra aumentado (Tabela XXIII).

**Tabela XXIII** – Principais causas de Neutrofilia, Eosinofilia, Basofilia, Monocitose e Linfocitose.<sup>[50;58]</sup>

Situação	Principais causas
<b>Neutrofilia</b>	Infeções; Inflamações; Necrose tecidual; Doenças metabólicas; Neoplasias; Hemorragia ou hemólise aguda; Fármacos
<b>Eosinofilia</b>	Alergias; Inflamações; Doenças parasitárias; Infeções; Síndromes pulmonares; Neoplasias; Síndromes hipereosinofílica
<b>Basofilia</b>	Doenças mieloproliferativas; Alergias; Infeções; Anemia hemolítica crônica; Inflamações
<b>Monocitose</b>	Infeções; Neutropenia crônica; Alterações hematológicas; Inflamações
<b>Linfocitose</b>	Infeções; Inflamação crônica; Mediação imunológica; Alterações hematológicas; Stress

O clínico patologista quando confrontado com valores demasiado elevados requer a realização de lâmina para observação do esfregaço de sangue periférico, de modo a confirmar ou não a presença deste tipo de situações.

Uma diminuição na contagem de leucócitos é denominada de leucopenia e se apenas for afetada contagem de um tipo de célula designa-se de neutropenia e linfopenia (Tabela XXIV). Os eosinófilos e basófilos, geralmente, já estão presentes em quantidades muito reduzidas.<sup>[55]</sup>

**Tabela XXIV** – Principais causas de Neutropenia e Linfopenia.<sup>[58]</sup>

Situação	Principais causas
<b>Neutropenia</b>	Fármacos; Radiação; Toxinas; Defeitos intrínsecos; Mediação imunológica; Alterações hematológicas; Infeções
<b>Linfopenia</b>	Destruição; Estado debilitado; Infeções; Imunodeficiência congénita; Síndrome da imunodeficiência Adquirida; Circulação linfática anormal

Geralmente, quando ocorrem aumentos transitórios significativos de neutrófilos (valor superior a 90%) os linfócitos apresentam valores reduzidos, assim como nos adultos pode

ocorrer a prevalência marcada de linfócitos em detrimento de neutrófilos, situação denominada de inversão da fórmula leucocitária. Em ambos os casos e quando não existe histórico, o clínico pede a realização de esfregaço de sangue periférico para confirmação.

### 1.3. PLAQUETOGRAMA

As plaquetas são resultado da fragmentação do citoplasma de grandes células da medula óssea, conhecidas como megacariócitos.<sup>[40]</sup> São responsáveis pela hemostase, por manter a integridade vascular e pelo processo de coagulação. A sua análise permite identificar situações de trombocitose, definida por um aumento do número de plaquetas ou de trombocitopenia, caracterizada por um número reduzido de plaquetas (Tabela XXV).<sup>[51]</sup>

**Tabela XXV-** Causas mais frequentes de Trombocitose e de Trombocitopenia.<sup>[50;59]</sup>

Situação	Causas
<b>Trombocitose</b>	Infeções; Inflamações; Perda de sangue crónica; Destruição eritrocitária; Esplenectomia; Síndromes mieloproliferativas
<b>Trombocitopenia</b>	Produção insuficiente; Aumento do consumo; Distribuição anormal; Perda dilucional

Dependendo do histórico clínico do doente, numa situação de trombocitopenia o clínico pede uma avaliação simples e rápida da amostra para verificar se esta se encontra coagulada justificando assim o valor reduzido de plaquetas. No entanto, se houver ausência de coágulo é realizado um esfregaço de sangue periférico, podendo-se encontrar plaquetas gigantes que explicariam a situação, ou é confirmada a trombocitopenia.

### **Volume Plaquetário Médio (MPV)**

Variável biológica que determina a função e atividade plaquetária, permitindo perceber melhor as várias desordens plaquetárias. Como marcador da atividade plaquetária é útil para o diagnóstico de doentes com alterações plaquetárias e, por essa razão é essencial em situações de trombocitopenias e trombocitoses.<sup>[60]</sup>

### **Dispersão do Volume Plaquetar (PDW)**

Este parâmetro traduz o índice de variação no tamanho das plaquetas.<sup>[53]</sup> Constitui um dado importante na avaliação das possíveis causas de trombocitopenias.

## 2. Estudo Morfológico do Sangue Periférico

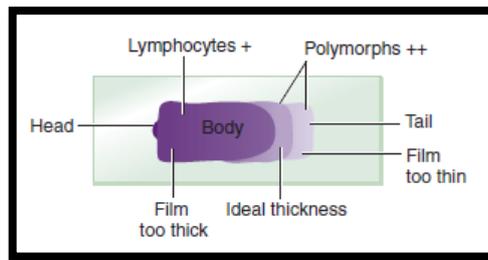
Como referido anteriormente, existem hemogramas que por cumprirem determinadas regras definidas pelo sistema SIS (Sysmex Information System) e pelo Serviço de Patologia Clínica do CHSJ são validados automaticamente pelo sistema.

Os hemogramas que exigem uma avaliação cuidada pelo clínico hematologista são aqueles que por algum motivo ativaram o alerta de “violação” dessas regras. Neste setor, tive oportunidade de conhecer os parâmetros (Tabela XXVI) que sugerem o estudo morfológico do sangue periférico através da execução de um esfregaço de sangue periférico.

**Tabela XXVI** - Parâmetros que sugerem a realização de esfregaço de sangue periférico.

Parâmetro	Causas
<b>Eritrócitos</b>	Fragmentos RBC
	Scattergram anormal de NRBC
	População dimórfica de RBC
<b>Leucócitos</b>	Scattergram anormal de WBC
	Suspeita de Blastos
	Monocitose Isolada não reativa (>15%)
	Contagem elevada de Granulócitos Imaturos (IG) $\geq 3\%$
	Linfócitos Anormais/Linfoblastos (HGB $\leq 11.5$ )
	Linfócitos Atípicos
	Eosinofilia (>20%)
	Basofilia ( $\geq 2\%$ )
<b>Plaquetas</b>	Pseudo trombocitopenia devido agregados plaquetários (PLT <140)
	Dificuldade de contagem de plaquetas

A realização do esfregaço consiste no espalhamento do sangue numa lâmina de vidro, de modo a formar cabeça, corpo e cauda, onde a cabeça corresponde ao início da extensão e a cauda ao final (Figura 11). A observação ao microscópio ótico deste deve ser realizada a partir do corpo em direção à cauda para evitar zonas de sobreposição celular (zona da cabeça) e, assim permitir a avaliação da morfologia celular, determinação da fórmula leucocitária, contagem semiquantitativa e avaliação de plaquetas e deteção de agentes parasitários.<sup>[52]</sup>



**Figura 11-** Esquema de um esfregaço de sangue periférico.<sup>[52]</sup>

No laboratório de hematologia laboratorial do CHSJ, os esfregaços podem ser executados automaticamente pelo Sysmex SP-1000i™ ou de forma manual pelo técnico hematologista. A maioria dos esfregaços é realizada de forma automática, no entanto em situações de amostras pediátricas em que o volume é reduzido executaram-se manualmente os respectivos esfregaços.

## Equipamentos

- Sysmex SP-1000i™

Este equipamento permite a preparação de lâminas automaticamente realizando todas as etapas envolvidas na preparação de um esfregaço, desde a aspiração até à coloração. Recebe as informações necessárias do sistema (SIS) de modo a produzir esfregaços com as condições definidas (consoante o valor do hematócrito efetua esfregaços mais ou menos espessos).<sup>[61]</sup> Quando se tratam de amostras com pouca quantidade, em que o esfregaço foi feito em modo manual, o equipamento tem a capacidade de realizar apenas a etapa de coloração.

A coloração May Grünwald Giemsa consiste numa mistura de corantes com características neutras que coram os componentes nucleares e citoplasmáticos das células. Desta forma, as células sanguíneas que apresentem elementos ácidos reagem com corantes básicos (azul de metileno) enquanto os elementos básicos reagem com os corantes ácidos (eosina) e os neutros reagem com ambos. Assim as estruturas ácidas são coradas de azul, as alcalinas alaranjados e as estruturas neutras de lilás.<sup>[62]</sup>

É possível fazer um controlo da qualidade do esfregaço através da observação das plaquetas, que devem apresentar uma coloração azulada.

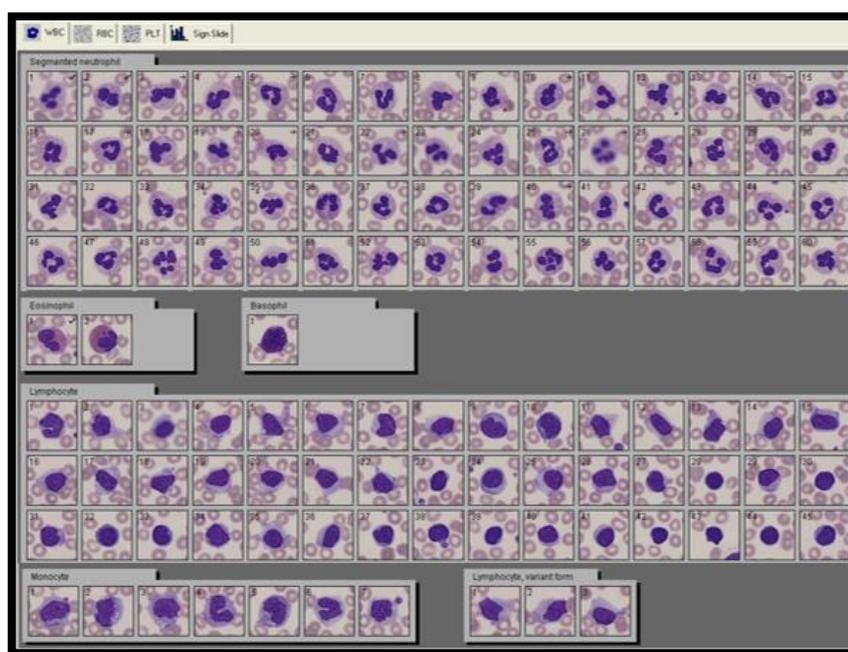
- Hema-Tek® 2000

Instrumento de coloração automática que fixa, cora e seca esfregaços. O método de coloração utiliza o corante de Wright modificado em que os corantes são sensíveis à concentração de íões de hidrogénio: a um pH alcalino acentua as colorações pelo azul-de-metileno e um pH ácido acentua as colorações pela eosina.<sup>[62]</sup> Ao observar o esfregaço ao microscópio, os núcleos e o citoplasma de linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos apresentaram características de coloração azulada e avermelhada.

O aparelho Hema-Tek® 2000 é utilizado quando se efetuam os esfregaços de forma manual para as amostras pediátricas ou quando as amostras apresentam um volume reduzido. Possibilita ainda a coloração de citoesfregaços de líquidos concentrados.

## 2.1. CellaVision™ DM96

Dispositivo automático de classificação celular, que permite a contagem diferencial de leucócitos, a caracterização morfológica dos eritrócitos e o cálculo de plaquetas a partir do esfregaço realizado no Sysmex SP-1000i™. Através da presença de uma unidade alimentadora de lâminas, uma unidade ótica constituída por um microscópio e uma câmara e interligação destes com o sistema informático, o equipamento permite: apresentar imagens de cada célula localizada, organizando e sugerindo uma classificação celular para os leucócitos (Figuras 12) e eritrócitos, sendo esta sujeita a alterações pelo clínico hematologista; fornecer o cálculo de plaquetas e imagens de agregados plaquetários e plaquetas gigantes.



**Figura 12** – Exemplo de uma classificação para leucócitos sugerida pelo equipamento CellaVision™ DM96

### 3. Velocidade de Sedimentação

A determinação da velocidade de sedimentação dos eritrócitos constitui um teste hematológico realizado diariamente no laboratório de hematologia do CHSJ, que apesar de inespecífico constitui um marcador útil em processos inflamatórios, uma vez que o seu valor está aumentado. A velocidade de sedimentação dos eritrócitos utiliza o método de Westergren modificado que recorre a tubos de hemograma com anticoagulante EDTA em vez de citrato.<sup>[62]</sup> A sua medição é executada automaticamente nos equipamentos VES-Matic Cube™ 200 e VES Matic™ 60 (Valores de referência em ANEXO II).

#### Equipamentos

- VES Matic Cube™ 200

O Ves-Matic Cube™ 200 é um instrumento usado para a determinação da velocidade de sedimentação eritrocitária. Esta determinação é realizada automaticamente (agitação e leitura) e os resultados, obtidos em cerca de 20 minutos, são baseados no método de Westergren modificado. As amostras são cuidadosamente misturadas pelo equipamento e posteriormente ficam em repouso, por um tempo predefinido, para se verificar a sedimentação. Através dos sensores de luz infravermelha, o instrumento determina automaticamente o nível de sedimentação e exprime os resultados em unidades Westergren citrato que posteriormente são convertidos em unidades Westergren EDTA.<sup>[51]</sup>

- VES Matic™ 60

Na rotina laboratorial este equipamento é utilizado para a análise de amostras com pouco volume, como é o caso das amostras pediátricas.

As amostras são colocadas em tubos Vacu-Tec, contendo anticoagulante citrato de sódio, onde são homogeneizadas pelo instrumento e seguidamente são deixadas a sedimentar durante um período de tempo. Após a agitação, são colocados numa posição com um ângulo específico de forma a ocorrer a primeira leitura, que mede a opacidade da coluna de sangue. A leitura seguinte é realizada 20 minutos após a primeira e permite obter o resultado da velocidade de sedimentação.

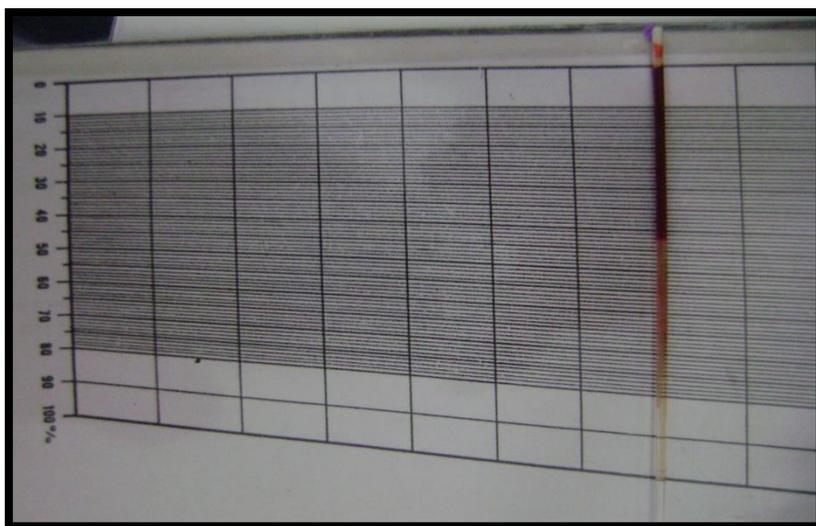
## 4. Procedimentos Complementares realizados em Hematologia Laboratorial

### 4.1. Microhematócrito

O microhematócrito é uma técnica manual complementar ao hemograma utilizada quando não é possível determinar automaticamente o valor do hematócrito em amostras com muito pouco volume de sangue.

Por atração capilar é preenchido cerca de 5cm um tubo capilar específico para a realização desta técnica e é colocado com a extremidade selada, com massa de modelar própria, nas ranhuras radiais de uma centrífuga, concebida especialmente para separar a coluna de sangue em eritrócitos, buffy coat e plasma. Após a centrifugação (12 000g/5min) é efetuada a leitura da zona dos eritrócitos através de uma régua de leitura (Figura 13).<sup>[51;52]</sup>

Um valor inferior ao intervalo de referência pode indicar uma situação de anemia, e um valor mais elevado, policitemia.<sup>[51]</sup>



**Figura 13** - Régua de leitura de microhematócrito.

### 4.2. Pesquisa de Eosinófilos na Urina – Citoesfregaço

A ocorrência de eosinófilos na urina não é comum, logo quando são detetados mais de 1% é considerado significativo. Para ser possível a pesquisa destas células é necessária uma urina concentrada e uma coloração adequada para detetar a sua presença. A hipersensibilidade a medicamentos, nefrite intersticial, outras doenças do trato geniturinário podem ser causas para eosinofilúria.<sup>[63]</sup>

## V. CONTROLO DE QUALIDADE

---

A prática da Medicina Laboratorial no CHSJ está associada à participação em Programas de Controlo de Qualidade Interno (C.Q.I.) e de Avaliação Externa de Qualidade (A.E.Q.).

Estes programas constam da execução de determinados procedimentos cujo objetivo é a deteção de possíveis erros e conseqüentemente a adoção de medidas que visam eliminá-los ou minimizá-los antes da validação dos resultados analíticos.

Cada área específica da Patologia Clínica tem procedimentos próprios de avaliação da Qualidade.

- Controlo de Qualidade Interno (C.Q.I.)

O C.Q.I. é realizado pelo próprio laboratório e por cada setor.

Na área de Microbiologia, o setor de Bacteriologia realiza semanalmente este controlo e consiste no processamento de estirpes ATCC (*American Type Culture Collection*). As estirpes ATCC são: *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus*; *Enterococcus faecalis*; *Haemophilus influenzae*; *Streptococcus pneumoniae*. Estas estirpes são submetidas à realização dos testes de identificação automatizados nos equipamentos VITEK® MS e VITEK® 2 e das respetivas Provas de Suscetibilidade aos Antimicrobianos realizadas manualmente (utilizando os discos e tiras de teste de antibióticos protocolados pelo CLSI) e no equipamento VITEK® 2 com carta de antibiograma correspondente. Também, semanalmente, são incubados *Campylobacter* spp e *Pseudomonas* spp em jarras de microaerofilia e anaerobiose, respetivamente, de modo a controlar estas atmosferas. Diariamente são realizadas provas de esterilidade dos soros onde se efetuam as suspensões microbianas para a realização do TSA, com o objetivo de descartar possíveis contaminações.

No setor de Virologia o C.Q.I. é realizado para a pesquisa de vírus respiratórios através de lâminas enviadas pelos fornecedores dos kits que contêm estes vírus (controlo positivo).

Assim, é possível avaliar se as amostras estão a ser processadas adequadamente.

Não é realizado um controlo de qualidade interno específico para o setor de Micologia assim como para o setor das Micobactérias. Diariamente são efetuadas, em gelose sangue (COS), provas de esterilidade das soluções tampão utilizadas.

Na área de Hematologia Laboratorial, o C.Q.I. consiste na análise diária de uma amostra de concentração conhecida, para avaliar a precisão dos resultados obtidos nos ensaios.

A avaliação deste controlo é feita através de curva controlo, constituindo um método simples mas fiável para monitorizar a estabilidade do equipamento.

O controlo dos equipamentos Sysmex XE®2100D™ e XE®5000™ é composto por eritrócitos, leucócitos e plaquetas humanas. Este é realizado no início do dia de trabalho com três níveis de controlo (baixo, médio e alto) de forma automática e um nível de controlo de forma manual e, durante a tarde, é efetuado apenas um nível de controlo de forma automática, que alterna todos os dias. Segundo as regras de Levy-Jennings, as cartas de controlo são verificadas e devem encontrar-se dentro dos limites estabelecidos, caso contrário os controlos devem ser repetidos. Nos equipamentos VES Matic 60™ e VES Matic Cube™ 200 são utilizados apenas dois níveis de controlo no início da manhã.

- Avaliação Externa da Qualidade (A.E.Q.)

A A.E.Q. consiste no processamento de amostras enviadas pelo Programa do UK NEQAS (United Kingdom National External Quality Assessment Service).

No laboratório de Microbiologia essas amostras são integradas na rotina laboratorial de cada setor e são processadas da mesma forma que as restantes amostras. O setor de Virologia não efetua este controlo.

As amostras são enviadas mensalmente, com exceção das amostras micológicas que são enviadas de 3 em 3 meses.

O patologista responsável de cada setor insere os resultados obtidos das análises realizadas na plataforma específica do Programa UK NEQAS.

No laboratório de Hematologia Laboratorial as amostras de sangue são analisadas nos equipamentos Sysmex XE®2100D™ e XE®5000™. É realizado um esfregaço de sangue periférico no Sysmex SP-1000i™ que será observado microscopicamente pelo hematologista clínico. Os dados dos hemogramas e a contagem das células do esfregaço são posteriormente inseridas na plataforma própria da entidade organizadora.

## VI. CONCLUSÃO

---

O estágio que realizei nas diversas áreas e setores do Serviço de Patologia Clínica do CHSJ permitiu a aquisição de novos conhecimentos e aprofundar outros que foram adquiridos durante o mestrado em análises clínicas.

A elevada automatização está presente em todas as áreas, mas esta é fundamental devido ao elevado número de amostras e parâmetros que são necessários analisar, para além de permitir uma redução dos erros laboratoriais.

No período em que decorreu o estágio tive a possibilidade de manipular vários produtos biológicos e acompanhar o seu percurso laboratorial e, em algumas áreas, proceder à sua validação clínica.

A interpretação dos resultados laboratoriais requer muitas vezes a avaliação do processo geral do doente, incluindo o histórico de idas anteriores ao hospital, envolvendo um vasto conhecimento por parte do patologista clínico relativamente a todas as outras áreas.

O controlo de qualidade interno (C.Q.I.) e a avaliação externa da qualidade (A.E.Q.) constituem uma importante ferramenta para a realização de análises clínicas.

A realização deste estágio permitiu-me assim adquirir uma visão global e compreender a aplicabilidade clínica de um laboratório de análises clínicas inserido num grande hospital de referência como é o CHSJ.

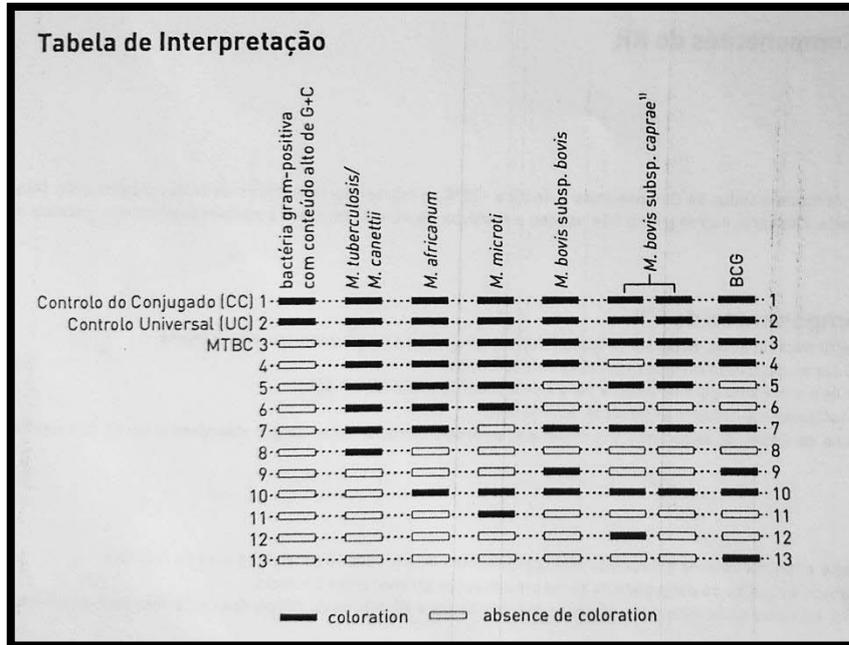
Considero que os objetivos propostos para o estágio foram atingidos, nomeadamente a integração no meio profissional e o contacto com os outros profissionais de saúde e aplicação dos conhecimentos adquiridos num contexto de trabalho.



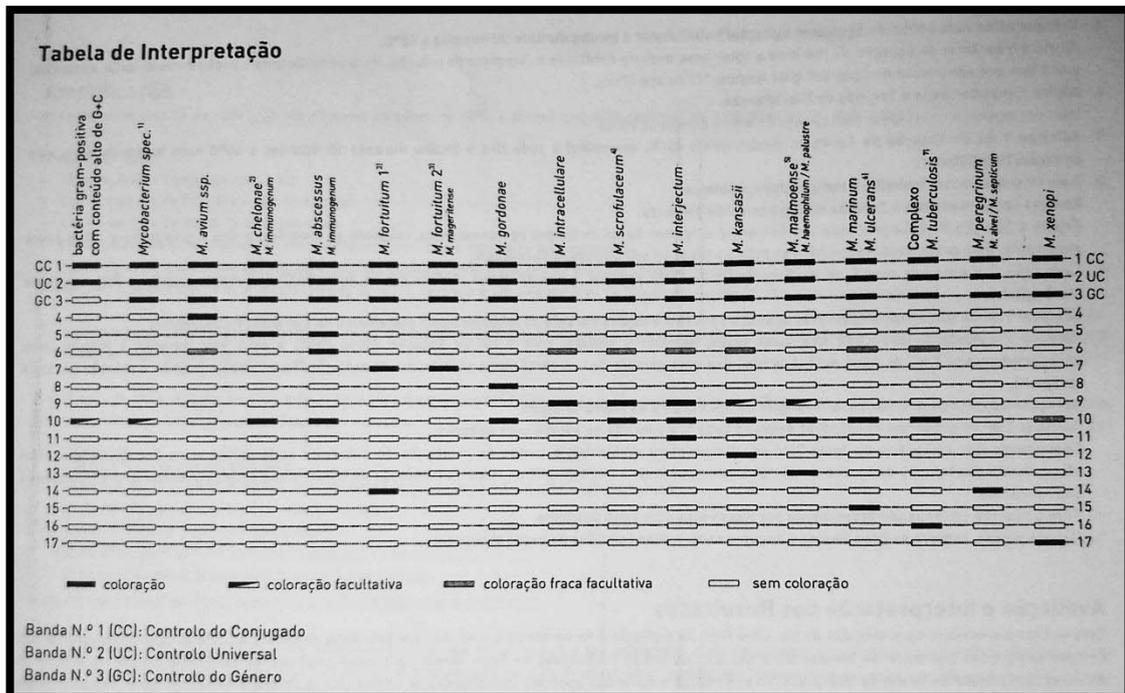
## VII. ANEXOS

### ANEXO I – Tabelas de Interpretação das tiras de Genotype *Mycobacterium*

#### GenoType *Mycobacterium* MTBC



#### GenoType *Mycobacterium* CM/AS



**ANEXO II – Valores de Referência [64]****HEMOGRAMA**

	<b>Homens</b>	<b>Mulheres</b>
<b>RBC</b>	$5.0 \pm 0.5 \times 10^{12}/l$	$4.3 \pm 0.5 \times 10^{12} /l$
<b>HGB</b>	$150 \pm 20 \text{ g/l}$	$135 \pm 15 \text{ g/l}$
<b>HCT</b>	$0.45 \pm 0.05 (l/l)$	$0.41 \pm 0.05 (l/l)$
<b>MCV</b>	$92 \pm 9 \text{ fl}$	
<b>MCH</b>	$29.5 \pm 2.5 \text{ pg}$	
<b>MCHC</b>	$330 \pm 15 \text{ g/l}$	
<b>RDW-CV</b>	$12.8 \pm 1.2 \%$	
<b>RDW-SD</b>	$42.5 \pm 3.5 \text{ fl}$	
<b>RET</b>	$50 - 100 \times 10^9 /l (0.5-2.5\%)$	
<b>WBC</b>	$4.0 - 10.0 \times 10^9 /l$	
<b>Neutrófilos</b>	$2.0 - 7.0 \times 10^9 /l (40-80\%)$	
<b>Linfócitos</b>	$1.0 - 3.0 \times 10^9 /l (20-40\%)$	
<b>Monócitos</b>	$0.2 - 1.0 \times 10^9 /l (2-10\%)$	
<b>Eosinófilos</b>	$0.02 - 0.5 \times 10^9 /l (1-6\%)$	
<b>Basófilos</b>	$0.02 - 0.1 \times 10^9 /l (<1-2\%)$	
<b>Plaquetas</b>	$280 \pm 130 \times 10^9 /l$	

**VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO**

	<b>Homens</b>	<b>Mulheres</b>
17 - 50 anos	$\leq 10$	$\leq 12$
51 - 60 anos	$\leq 12$	$\leq 19$
61 - 70 anos	$\leq 14$	$\leq 20$
>70 anos	$\leq 30$	$\leq 35$

## ANEXO III

### Sysmex® XE-2100D™: Parâmetros de Análise [42]

WBC	Contagem total de leucócitos	P-LCR	% plaquetas grandes
RBC	Contagem total de eritrócito	PCT	Plaquetócrito
HGB	Concentração de hemoglobina	NEUT%	% Neutrófilos
HCT	Hematócrito	LYMPH%	% Linfócitos
MCV	Volume médio dos RBC	MONO%	% Monócitos
MCH	Volume médio de HGB por cada RBC	EO%	% Eosinófilos
MCHC	Concentração média de hemoglobina dos RBC	BASO%	% Basófilos
RDW-SD	Amplitude de distribuição de RBC (Desvio Padrão)	NEUT#	Contagem absoluta de Neutrófilos
RDW-CV	Amplitude de distribuição de RBC (Coeficiente de Variação)	LYMPH#	Contagem absoluta de Linfócitos
PLT	Contagem total de Plaquetas	MONO#	Contagem absoluta de monócitos
PDW	Dispersão do volume plaquetar	EO#	Contagem absoluta de eosinófilos
MPV	Volume médio de plaquetas	BASO#	Contagem absoluta de Basófilos

### Sysmex® XE-2100D™: Parâmetros de Pesquisa [42]

IG%	Percentagem de granulócitos imaturos
IG#	Contagem absoluta de granulócitos imaturos
OTHER%	Percentagem de células muito fluorescentes (ex. linfócitos atípicos)
OTHER#	Contagem absoluta de células muito fluorescentes (ex. linfócitos atípicos)

## ANEXO IV

### Sysmex® XE-5000™: Parâmetros de Diagnóstico

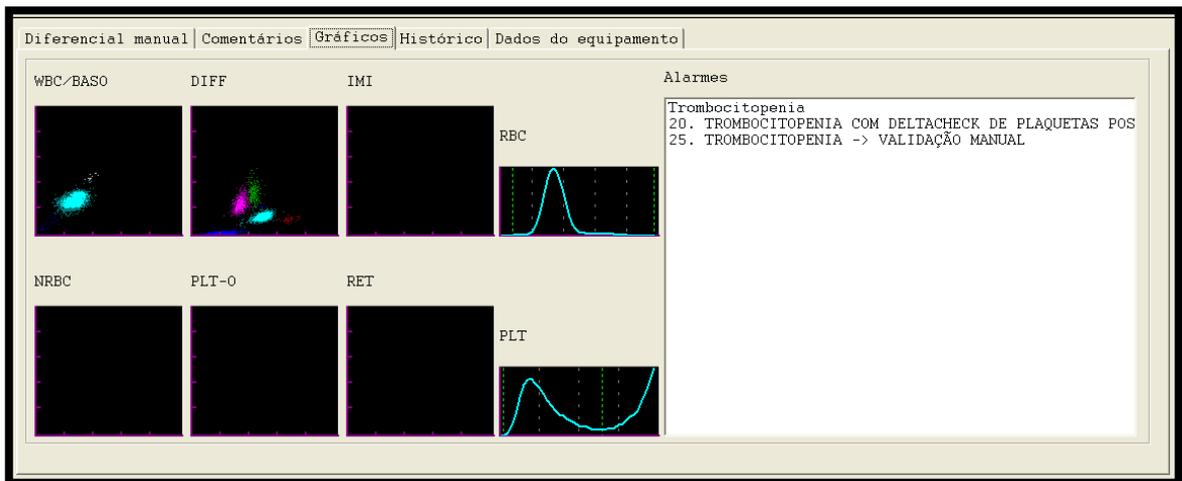
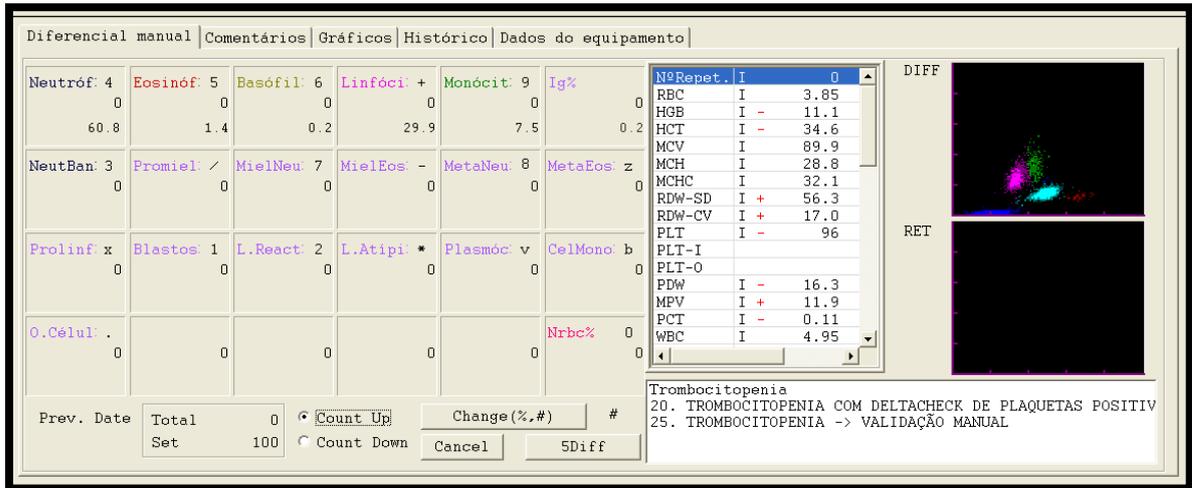
Dos 64 parâmetros que este equipamento analisa, 24 são os mesmos que o Sysmex® XE-2100D™ determina. Para além destes possui outros canais específicos que permitem a determinação dos seguintes parâmetros <sup>[44]</sup>:

IG%	Percentagem de granulócitos imaturos
IG#	Contagem de granulócitos imaturos
HPC#	Contagem de células progenitoras hematopoiéticas
NRBC%	Percentagem de eritroblastos
NRBC#	Contagem de eritroblastos
RET%	Percentagem de reticulócitos
RET#	Contagem de reticulócitos
HFR	Relação de fluorescência alta
MFR	Relação de fluorescência média
LFR	Relação de fluorescência baixa
IRF	Fração de reticulócitos imaturos
RET-He	Equivalente de hemoglobina reticulocitária
IRF	Fração de PLT imaturos

### Sysmex® XE-5000™: Parâmetros para modo de Fluidos Corporais <sup>[44]</sup>

WBC-BF	Fluido corporal WBC
MN%	Percentagem de células mononucleares
MN#	Contagem de células mononucleares
PMN%	Percentagem de células polimorfonucleares
PMN#	Contagem de células polimorfonucleares
RBC-BF	Fluido corporal RBC

**ANEXO V – Página de resultados de um hemograma efetuado no Sysmex® XE-5000™**





## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- 1) PLOTKWSKI, Maria – Cultivo *in vitro*: principios y aplicaciones. In: MURRAY, Patrick; ROSENTHAL, Ken; PFALLER, Michael. Microbiología Médica. 6ª Ed., Barcelona: Elsevier Mosby, 2009. ISBN 978-84-8086-465-6. p. 161-164.
- 2) PORTUGAL. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge - Programa Nacional de Controlo da Infecção: Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em Bacteriologia. 2004.
- 3) LEHMAN, Donald – Selected Bacteriologic Culture Media. In: MAHON, Connie; LEHMAN, Donald; MANUSELIS, George. A Textbook of Diagnostic Microbiology. 5ª Ed., Missouri, Elsevier Editora Lda., 2014. ISBN 978-0-323-08989-0. p. 977-993.
- 4) LEHMAN, Donald – *Mycobacterium tuberculosis* and Nontuberculous Mycobacteria. In: MAHON, Connie; LEHMAN, Donald; MANUSELIS, George. A Textbook of Diagnostic Microbiology. 5ª Ed., Missouri, Elsevier Editora Lda., 2014. ISBN 978-0-323-08989-0. p. 563-588.
- 5) DOMINGO, Antonia et al. - Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinário. In: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Procedimientos em Microbiología Clínica. Madrid: SEIMC, 2010. [Acedido a 4 de Janeiro de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.seimc.org>
- 6) BLANCKAERT, H et al. – Optimisation of Prenatal Group B Streptococcal Screening. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 22,10 (2003) 619–621.
- 7) OLIVEIRA, Jeferson – Tópicos em Micologia Médica. 4ªEd., Rio de Janeiro. 2014. ISBN 85-900986-1-3
- 8) O'HARA, Caroline; WEINSTEIN, Melvin; MILLER, J. Michael – Manual and Automated systems for Detection and Identification of Microorganisms. In: MURRAY, Patrick et al. Manual of Clinical Microbiology. 8ª Ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2003, ISBN 1-55581-255-4. p. 185-207.
- 9) RYAN, Kenneth; RAY, George – Principles of Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases. In: RYAN, Kenneth; RAY, C. George. Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases. 4ª Ed. New York: McGraw-Hill, 2004, ISBN 0-83-858529-9. p. 229 – 258.

- 10) MANUSELIS, George; MAHON, Connie – Bacterial Cell Structure, Physiology, Metabolism, and Genetics. In: MAHON, Connie; LEHMAN, Donald; MANUSELIS, George. Textbook of Diagnostic Microbiology. 5ª Ed. New York: Saunders Elsevier, 2014, ISBN 978-0-323-08989-0. p. 2 - 22.
- 11) FALCÃO, Juliana; FALCÃO, D. - Importância de *Yersinia enterocolitica* em microbiologia médica. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. 27,1 (2006) 9-19.
- 12) PACHECO, Susan; COOK, James – Upper and Lower Respiratory Tract Infections. In: MAHON, Connie; LEHMAN, Donald; MANUSELIS, George. A Textbook of Diagnostic Microbiology. 5ª Ed., Missouri, Elsevier Editora Lda., 2014. ISBN 978-0-323-08989-0. p. 765-803.
- 13) MAHON, Connie; MAHLEN, Steven – Host-Parasite Interaction. In: MAHON, Connie; LEHMAN, Donald; MANUSELIS, George. A Textbook of Diagnostic Microbiology. 5ª Ed., Missouri, Elsevier Editora Lda., 2014. ISBN 978-0-323-08989-0. p. 23 - 46.
- 14) LEHMAN, Donald – Immunodiagnosis of infectious Diseases. In: MAHON, Connie; LEHMAN, Donald; MANUSELIS, George. A Textbook of Diagnostic Microbiology. 5ª Ed., Missouri, Elsevier Editora Lda., 2014. ISBN 978-0-323-08989-0. p. 198 - 225.
- 15) LEHMAN, Donald; MANUSELIS, George – *Haemophilus* and Other Fastidious Gram-Negative Bacilli. In: MAHON, Connie; LEHMAN, Donald; MANUSELIS, George. A Textbook of Diagnostic Microbiology. 5ª Ed., Missouri, Elsevier Editora Lda., 2014. ISBN 978-0-323-08989-0. p. 390 - 419.
- 16) LEHMAN, Donald – Biochemical Identification of Gram-Negative Bacteria. In: MAHON, Connie; LEHMAN, Donald; MANUSELIS, George. A Textbook of Diagnostic Microbiology. 5ª Ed., Missouri, Elsevier Editora Lda., 2014. ISBN 978-0-323-08989-0. p. 181 - 197.
- 17) DUBOIS, Damien *et al.* - Performances of the Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry System for Rapid Identification of Bacteria in Routine Clinical Microbiology. Journal of Clinical Microbiology. 50,8 (2012) 2568–2576.
- 18) MARSIK, Frederic – Antimicrobial Susceptibility Testing. In: MAHON, Connie; LEHMAN, Donald; MANUSELIS, George. A Textbook of Diagnostic Microbiology. 5ª Ed., Missouri, Elsevier Editora Lda., 2014. ISBN 978-0-323-08989-0. p. 274 - 312.
- 19) RENNIE, Robert *et al.* - Multicenter Evaluation of the New Vitek 2 *Neisseria-Haemophilus* Identification Card. Journal of Clinical Microbiology. 46,8 (2008) 2681–2685.
- 20) BioMérieux SA - VITEK® 2 ID Cards. Marcy-l'Étoile: bioMérieux SA, 2015. [Acedido a 19 de Fevereiro de 2015]. Disponível na Internet: [www.biomerieux.com](http://www.biomerieux.com)

- 21) BioMérieux SA - Myla®: IT Performance Management Solutions. Marcy-l'Etoile: bioMérieux SA, 2015. [Acedido a 19 de Fevereiro de 2015]. Disponível na Internet: [www.biomerieux.com](http://www.biomerieux.com)
- 22) BioMérieux SA - VITEK® 2 AST Cards. Marcy-l'Etoile: bioMérieux SA, 2015. [Acedido a 19 de Fevereiro de 2015]. Disponível na Internet: [www.biomerieux.com](http://www.biomerieux.com)
- 23) MURRAY, Patrick, ROSENTHAL, Ken; PFALLER, Michael - Microbiologia Médica. 5ª Ed, Elsevier, Rio de Janeiro, 2006. ISBN 978-85-352-1838-1
- 24) FOTHERGILL, Annette – Medically Significant Fungi. In: MAHON, Connie; LEHMAN, Donald; MANUSELIS, George. A Textbook of Diagnostic Microbiology. 5ª Ed., Missouri, Elsevier Editora Lda., 2014. ISBN 978-0-323-08989-0. p. 589 – 624.
- 25) MATOS, Olga et al. - Infecção por *Pneumocystis jirovecii*: Em imunocompetentes com Patologia Pulmonar, em Portugal. Acta Médica Portuguesa. 19,2 (2006) 121–126.
- 26) RYAN, Kenneth – Characteristics of Fungi. In: RYAN, Kenneth; RAY, C. George. Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases. 4ª Ed. New York: McGraw-Hill, 2004, ISBN 0-83-858529-9. p. 631 – 638.
- 27) VEGA, Fernando et al. – Micobacterias. In: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Procedimientos em Microbiología Clínica. Madrid: SEIMC, 2005. [Acedido a 4 de Janeiro de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.seimc.org>
- 28) LEHMAN, Donald – *Mycobacterium tuberculosis* and Nontuberculous Mycobacteria. In: MAHON, Connie; LEHMAN, Donald; MANUSELIS, George. A Textbook of Diagnostic Microbiology. 5ª Ed., Missouri, Elsevier Editora Lda., 2014. ISBN 978-0-323-08989-0. p. 563 - 588.
- 29) CLOUD, Joann et al. - Interpretive criteria for use of AccuProbe for Identification of *Mycobacterium avium* Complex Directly from 7H9 Broth Cultures. Journal of Clinical Microbiology. 43,7 (2005) 3474–3478.
- 30) RUIZ, P. et al. - GenoType Mycobacterium Assay for Identification of Mycobacterial Species Isolated from Human Clinical Samples by Using Liquid Medium. Journal of Clinical Microbiology. 40,8 (2002) 3076-3078.
- 31) LEE, Andie S. et al. - Identification of non-tuberculous mycobacteria: Utility of the GenoType Mycobacterium CM/AS assay compared with HPLC and 16S rRNA gene sequencing. Journal of Medical Microbiology. 58,7 (2009) 900–904.
- 32) CUNHA, J. - Testes de sensibilidade à pirazinamida em todos os isolados do complexo *Mycobacterium tuberculosis*: uma análise crítica. Revista Portuguesa de Pneumologia. 18,4 (2012) 188–189.

- 33) SMITH, Linda – Diagnostic Parasitology. In: MAHON, Connie; LEHMAN, Donald; MANUSELIS, George. A Textbook of Diagnostic Microbiology. 5ª Ed., Missouri, Elsevier Editora Lda., 2014. ISBN 978-0-323-08989-0. p. 625 - 687.
- 34) McNABB, Kevin – Clinical Virology. In: MAHON, Connie; LEHMAN, Donald; MANUSELIS, George. A Textbook of Diagnostic Microbiology. 5ª Ed., Missouri, Elsevier Editora Lda., 2014. ISBN 978-0-323-08989-0. p. 688 - 726.
- 35) OSAWA, Ryosuke; SINGH Nina. Cytomegalovirus infection in critically ill patients: A systematic review. Crit Care. 13, 3 (2009) 68.
- 36) ELHAG, Wafa et al. - Prevalence of rotavirus and adenovirus associated with diarrhea among displaced communities in Khartoum, Sudan. BMC infectious diseases. 13,209 (2013) 1471-2334.
- 37) AKAN, Hulya et al. - Rotavirus and adenovirus frequency among patients with acute gastroenteritis and their relationship to clinical parameters: a retrospective study in Turkey. Asia Pacific Family Medicine. 8 (2009) 1-8.
- 38) Coris BioConcept. – Combi-Strip: Rapid diagnostic test for *in vitro* detection of Rotavirus & Adenovirus in stool specimens. Gembloux: Coris BioConcept, 2012 [Acedido a 2 de Fevereiro de 2015]. Disponível na Internet: [www.corisbio.com](http://www.corisbio.com)
- 39) TERRA, Paulo – Coagulação: Interpretação Clínica dos Testes Laboratoriais de Rotina. 3ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2004. ISBN 8573792795.
- 40) BAIN, Barbara – A Beginner's Guide Blood Cells. 2ª Ed., Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2004. ISBN 978-1-4051-2175-0.
- 41) FAILACE, Renato – Hemograma: manual de interpretação. 5ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. ISBN 978-85-363-2081-6.
- 42) JAPÃO. Sysmex Corporation – XE-2100D Analisador automático de hematologia: Instruções de utilização. Kobe: Sysmex Corporation, 2003.
- 43) BAIN, Barbara – Performing a blood count. In: BAIN, Barbara. Blood Cells: A Practical Guide. 4ª Ed., Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2006. ISBN 978-1-4051-4265-6. p. 20-60.
- 44) JAPÃO. Sysmex Corporation – Analisador de Hematologia Automático XE-5000: Instruções de Utilização. Kobe: Sysmex Corporation, 2007.
- 45) Sysmex America, Inc – XE-5000™: Sistema Automatizado para Hematologia. Illinois: Sysmex America, 2010. [Acedido a 22 de Abril de 2015]. Disponível na Internet: <https://www.sysmex.com>
- 46) LEHNER, Joachim; GREVE, Burkhard; CASSENS, Uwe - Automation in hematology. Transfusion Medicine and Hemotherapy. 34,5 (2007) 328–339.

- 47) SUNHEIMER, Robert et al – Analysis: Principles of instrumentation. In: McPHERSON, Richard; PINCUS, Matthew. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22<sup>a</sup> Ed., Philadelphia: Elsevier Saunders, 2007. ISBN: 978-1-4377-0974-2. p. 37-63.
- 48) MIECZKOWSKA, Elżbieta; KONCKI, Robert; TYMECKI, Łukasz - Hemoglobin determination with paired emitter detector diode. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 399,9 (2011) 3293–3297.
- 49) CLARK, Karen; HIPPEL, Teresa – Pruebas de rutina en hematología. In: RODAK, Bernadette. Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas. 2<sup>a</sup> Ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2004. ISBN 950-06-1876-1. p 155-172.
- 50) HOFFBRAND, Victor; MOSS, Paul - Fundamentos em Hematologia. 6<sup>a</sup> Ed., Porto Alegre: Artemed, 2013. ISBN: 978-65852-30-2.
- 51) VAJPAYEE, Neerja; GRAHAM, Susan; BEM, Sylva – Basic Examination of Blood and Bone Marrow. In: McPHERSON, Richard; PINCUS, Matthew. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22<sup>a</sup> Ed., Philadelphia: Elsevier Saunders, 2007. ISBN: 978-1-4377-0974-2. p. 509-535.
- 52) BRIGGS, Carol; BAIN, Barbara - Basic haematological techniques. In: BAIN, Barbara et al. Dacie and Lewis practical haematology. 11<sup>a</sup> Ed., Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2012. ISBN: 978-0-7020-3408-4. p. 23-56.
- 53) PORTUGAL. Direcção-Geral da Saúde – Abordagem, Diagnóstico e Tratamento da Ferropénia no Adulto. Lisboa: DGS, 2015.
- 54) BAIN, Barbara – Blood cell morphology in health and disease. In: BAIN, Barbara et al. Dacie and Lewis practical haematology. 11<sup>a</sup> Ed., Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2012. ISBN: 978-0-7020-3408-4. p. 69-100.
- 55) PINCUS, Matthew; ABRAHAM Jr, Naif – Interpreting Laboratory Results. In: McPHERSON, Richard; PINCUS, Matthew. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22<sup>a</sup> Ed., Philadelphia: Elsevier Saunders, 2007. ISBN: 978-1-4377-0974-2. p. 91-108.
- 56) BAIN, Barbara –Important supplementary tests. In: BAIN, Barbara. Blood Cells: A Practical Guide. 4<sup>a</sup> Ed., Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2006. ISBN 978-1-4051-4265-6. p. 263-282.
- 57) ELGHETANY, M. Tarek; BANKI, Katalin – Erythrocytic Disorders. In: McPHERSON, Richard; PINCUS, Matthew. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22<sup>a</sup> Ed., Philadelphia: Elsevier Saunders, 2007. ISBN: 978-1-4377-0974-2. p. 557-600.

- 58) HUTCHISON, Robert; SHEXNEIDER, Katherine –Leukocytic Disorders. In: McPHERSON, Richard; PINCUS, Matthew. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22<sup>a</sup> Ed., Philadelphia: Elsevier Saunders, 2007. ISBN: 978-1-4377-0974-2. p. 601-655.
- 59) BATES, Imelda; BAIN, Barbara – Approach to the diagnosis and classification of blood diseases. In: BAIN, Barbara et al. Dacie and Lewis practical haematology. 11<sup>a</sup> Ed., Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2012. ISBN: 978-0-7020-3408-4. p. 549-562.
- 60) FARIAS, Mariela; BÓ, Suzane - Importância clínica e laboratorial do volume plaquetário médio. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 46,4 (2010) 275–281.
- 61) JAPÃO. Sysmex Corporation – Unidade Automatizada de Preparação e Lâminas para Hematologia SP-1000i: Instruções de Utilização. Kobe: Sysmex Corporation, 2004.
- 62) BAIN, Barbara; LEWIS, S. Mitchell – Preparation and staining methods for blood and bone marrow films. In: BAIN, Barbara et al. Dacie and Lewis practical haematology. 11<sup>a</sup> Ed., Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2012. ISBN: 978-0-7020-3408-4. p. 57-68.
- 63) McPHERSON, Richard; BEM-EZRA, Jonathan – Basic Examination of Urine. In: McPHERSON, Richard; PINCUS, Matthew. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22<sup>a</sup> Ed., Philadelphia: Elsevier Saunders, 2007. ISBN: 978-1-4377-0974-2. p. 445-479.
- 64) BATES, Imelda; LEWIS, S. Mitchell – Reference ranges and normal values. In: BAIN, Barbara et al. Dacie and Lewis practical haematology. 11<sup>a</sup> Ed., Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2012. ISBN: 978-0-7020-3408-4. p. 11-22.