



Verónica Melissa Lourenço Domingues

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dr. Paulo João Soares e pela Professora Doutora Ana Miguel Matos e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Verónica Melissa Lourenço Domingues

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas,
orientado pelo Dr. Paulo João Soares e pela Professora Doutora Ana Miguel
Matos e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2017

FFUC FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA



AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Dr. Paulo João Soares, por me ter recebido no Laboratório São José para realizar o meu estágio curricular, mostrando disponibilidade, paciência para as minhas falhas e transmitindo algum do seu conhecimento durante a minha permanência.

A toda a equipa do Laboratório São José, que me acolheu com simpatia e se mostrou sempre disponível, fazendo-me sentir como se fosse da “família”. Um agradecimento especial para a Magda, Milene, Michael, Maria, e Carolina, colegas com dedicação, que me foram transmitindo alguns dos seus conhecimentos, esclarecendo as minhas dúvidas e que me integraram na sua equipa.

Agradeço também a todos os Professores que ao longo deste Mestrado me transmitiram os seus conhecimentos nas várias disciplinas lecionadas, conhecimentos que são o ponto de partida para a melhoria da nossa prática profissional. Um especial obrigado à Professora Doutora Leonor de Almeida, coordenadora deste Mestrado e à Professora Doutora Ana Miguel Matos, minha orientadora interna, pela vossa confiança, disponibilidade e apoio.

Aos colegas que conheci neste Mestrado, pela vossa boa disposição, a vossa ajuda e carinho que tornaram esta caminhada muito mais agradável.

Não posso esquecer também a todos os colegas e profissionais que ao longo de toda a minha atividade profissional me ensinaram e ajudaram a tornar-me na profissional que sou hoje, despertando em mim o espírito crítico, a necessidade de melhoria contínua e a vontade de ir sempre mais-além. A todos os que me colocaram e colocam desafios e não me deixam estagnar, o meu muito obrigada.

À minha colega e amiga, Maria Rita, que apesar de longe, sempre me apoiou durante o decorrer deste Mestrado, dando-me força para eu não desistir quando as dificuldades pareciam maiores.

Apesar de terem ficado para o fim, o meu maior obrigado vai para a minha Família, sem os quais nada do resto faz sentido. À minha mãe, pelo seu amor, presença e apoio incondicional, sempre. Sei que as minhas vitórias também são tuas. Ao Jorge, meu marido, pelo amor, por toda a paciência, apoio e pelas vezes que teve que fazer de pai e mãe para colmatar as minhas ausências e dar-me espaço e tempo para poder dedicar-me a este meu projeto. Aos meus filhos, Maria Victória e Martim, que nasceram e cresceram no decorrer deste percurso e aos quais peço desculpas pelas minhas ausências, pelas minhas impaciências e pelo tempo que às vezes não vos dediquei e que jamais recuperarei. Quero agradecer-vos

todo o amor que apesar destas minhas “falhas” vocês me oferecem diariamente, apenas pedindo uma única moeda em troca, Amor.

RESUMO

As análises clínicas são ferramentas essenciais que auxiliam o clínico no diagnóstico, prognóstico e na tomada de decisões terapêuticas adequadas. É importante que a ligação entre os dados clínicos e os dados laboratoriais sejam utilizados de forma adequada e rentabilizando a máximo os recursos disponíveis.

O objetivo do estágio no Laboratório São José foi colocar em prática os conhecimentos adquiridos durante o Mestrado nas várias componentes teóricas e adquirir uma visão diferente da realidade que existe fora dos serviços hospitalares de Patologia Clínica, que foi sempre a realidade com a qual tive contacto desde o início da minha atividade profissional.

Culmino com a apresentação deste relatório de estágio que visa explicar toda a atividade laboratorial desenvolvida durante o período de estágio.

As quatro grandes valências das análises clínicas são: Hematologia, Bioquímica, Microbiologia e Imunologia. Algumas destas valências já fazem parte do meu dia-a-dia na minha atividade profissional, as outras apenas tive contato durante o meu percurso académico, não tendo nunca trabalhado diretamente nessas áreas. Durante o estágio foi-me possível contactar com todas estas valências. No Laboratório São José a polivalência é fundamental e toda a equipa executa as análises das várias valências.

Sendo as áreas de Microbiologia e Hematologia as valências com as quais menos contacto tenho tido ao longo do meu percurso profissional, optei por me debruçar essencialmente nelas neste relatório, pelo interesse que me despertam, pela sua abrangência, assim como, pela importância que estas representam ao nível clínico.

Faço uma breve referência as outras valências, assim como, refiro a importância da execução de controlos de qualidade, que garantam resultados fiáveis e precisos.

ABSTRACT

The clinical analysis are essential tools to support the doctors in providing a diagnosis, a prognosis and in the decision taken process for therapeutic decisions. It is of utmost importance the connection between the clinical data from the patient and the laboratorial data. These will enable a correct and effective usage of the available clinical resources.

The main objective of the present fellowship in the São José Laboratory was focused in putting into practice the acquired knowledge during the master's, including all the theoretical components, to acquire a different view of the reality outside the class room. The fellowship in this lab allow also to understand the reality of laboratories outside of the large main hospital pathology labs.

This report is the final activity that resumes the overall laboratorial activity performed during the fellowship.

The major groups related with the clinical analysis are: Haematology, Biochemistry, Microbiology and Immunology. Due to my professional activity (inside a main hospital pathology lab), some of the groups are part of the day by day work, the remaining I've only had interactions with during the previous academic degree. During the current fellowship was possible to explore the four groups, with emphasis on Microbiology and Haematology. These are the groups that are not part of my day to day work. In the São José laboratory, the team is multidisciplinary, being responsible for the clinical analysis in all the groups.

Being the areas of Microbiology and Haematology the ones that I had less contact during my professional experience, the option was to detail more on these and less on the others (Biochemistry and Immunology). This choice was also based in the interest and fascination that these two areas present to me. And, of course, due to the clinical importance that these two areas represent at the clinical landscape.

This report presents the four main groups, with special focus on the Microbiology and Haematology groups with detailed explanations of techniques and results. The report also mentions the quality control necessary to achieve the excellence required in this type of work.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	19
2. DESCRIÇÃO DO SERVIÇO	21
3. CONTROLO DE QUALIDADE	25
3.1. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO	25
3.2. AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE	26
4. SECTOR DE HEMATOLOGIA	27
4.1. HEMOGRAMA	28
4.1.1 ERITRÓCITOS	29
4.1.2 RETICULÓCITOS	31
4.1.3 LEUCÓCITOS	33
4.1.4 PLAQUETAS	35
4.2. CONTAGENS NA CÂMARA DE NEUBAUER	36
4.3. ESFREGAÇO DE SANGUE PERIFÉRICO	37
4.4. VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO	39
4.5. ELECTROFORESE DE HEMOGLOBINAS	39
4.6. CASOS CLÍNICOS	40
4.6.1 CASO CLÍNICO I	40
4.6.2 CASO CLÍNICO II	42
4.7. HEMOSTASE	43
4.7.1 TEMPO DE PROTROMBINA	45
4.7.2 TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA	46
4.7.3 TEMPO DE TROMBINA	46
4.7.4 DOSEAMENTO DE FIBRINOGENIO (Método de Clauss)	47
4.7.5 PESQUISA DE ANTICOAGULANTE LÚPICO	47
4.7.6 DOSEAMENTO DE D-DÍMEROS	48
4.7.7 CASOS CLÍNICOS	48
4.7.7.1 CASO CLÍNICO III	48
4.7.7.2 CASO CLÍNICO IV	49
4.8. IMUNO-HEMATOLOGIA	50
4.8.1 SISTEMA AB0 E Rh	50
4.8.2 TESTE DE COOMBS	52
5. SECTOR MICROBIOLOGIA	53
5.1. HEMOCULTURA (SANGUE)	53
5.2. FEZES	57
5.3. URINA	61
5.4. EXSUDATOS PURULENTOS E LÍQUIDO DE SEROSAS	65
5.5. LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO	66
5.6. EXSUDATOS VAGINAIS / URETRAIS	67
5.7. SECREÇÕES RESPIRATÓRIAS	68
5.8. EXSUDATO OROFARINGE	69
5.9. PESQUISA DE <i>Streptococcus</i> DO GRUPO B	70
5.10. DIAGNÓSTICO DE MICOSES SUPERFICIAIS	71
5.11. IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS	72
5.11.1 HEMÓLISE	72
5.11.2 OXIDASE	73
5.11.3 CATALASE	73
5.11.4 COAGULASE	73
5.11.5 INDOL	74
5.11.6 FERMENTAÇÃO DO MANITOL	74

5.11.7	TESTE CAMP	74
5.11.8	PROVA DA SENSIBILIDADE À OPTOQUINA	75
5.11.9	FERMENTAÇÃO DE AÇÚCARES	75
5.11.10	PROVA DA SENSIBILIDADE À BACITRACINA	76
5.11.11	HIDRÓLISE DA ESCULINA BÍLIS	76
5.11.12	SISTEMAS DE IDENTIFICAÇÃO MANUAL	77
5.12.	TESTES DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS	78
5.13.	CASO CLÍNICO	79
5.13.1	CASO CLÍNICO V	79
6.	DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS	81
6.1.	VÍRUS	81
6.1.1	VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA	81
6.1.2	HEPATITES VIRAIS	84
6.1.3	CITOMEGALOVÍRUS	86
6.1.4	EPSTEIN-BARR	87
6.1.5	RUBÉOLA	88
6.1.6	HERPES SIMPLEX I E 2	88
6.2.	PARASITAS	89
6.2.1	TOXOPLASMOSE	89
6.3.	BACTÉRIAS	90
6.3.1	SÍFILIS	90
6.3.2	<i>Chlamydia trachomatis</i>	91
6.3.3	<i>Brucella</i>	91
6.3.4	<i>Salmonella</i>	92
6.4.	CASO CLÍNICO	92
6.4.1	CASO CLÍNICO VI	93
7.	SECTOR BIOQUÍMICA CLÍNICA	95
8.	SECTOR IMUNOLOGIA	97
9.	SECTOR ENDOCRINOLOGIA	99
10.	CONCLUSÃO	101
	BIBLIOGRAFIA	103
	ANEXO A. COLORAÇÃO DE GRAM	107
	ANEXO B. MÉTODO DE RITCHIE (PRINCÍPIO DE SEDIMENTAÇÃO)	107

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1: Método de contagem e diferenciação dos leucócitos pela tecnologia MAPSS - A: Princípio de contagem ótica de células por medição de luz refratada (citometria de fluxo); B: Características celulares e ângulos de medição; C: Histograma do diferencial de WBC gerado pela combinação de sinais de dispersão.....	33
Figura 2: Esfregaço de sangue periférico. A: Método de distensão de sangue periférico; B: representação das 3 áreas da distensão (1: cabeça ou ponto de aplicação - área muito espessa e 3: franjas - área muito fina. Não adequadas para observação; 2: Corpo/monocamada do esfregaço – local ideal de observação).....	38
Figura 3: Cascata da Coagulação.....	44
Figura 4: Sistema de hemocultura OXOID SIGNAL®.....	55
Figura 5: Meios sólidos utilizados para subcultura de hemocultura – A: Meio Columbia Agar+Sheep Blood Plus; B: Meio Chocolate Agar+Vitox.....	56
Figura 6: Esquema representativo da técnica de esgotamento por extensão à superfície do meio sólido. 1: Esgotamento inicial; 2,3 e 4: Sequência de estrias.....	56
Figura 7: Meios utilizados para coprocultura – A: Meio Hektoen Enteric; B: Meio de Chapman; C: Meio <i>Campylobacter</i> Karmali Selective.....	57
Figura 8: Meio <i>Yersinia</i> Selective com crescimento de colónias de <i>Yersinia enterocolitica</i>	59
Figura 9: Esquema da preparação da amostra, execução e interpretação de resultados do teste imunocromatográfico para pesquisa de toxinas A e B de <i>C. difficile</i>	60
Figura 10: Esquematização do método Ritchie para concentração de parasitas.	61
Figura 11: Meio para urocultura – Brillance UTI clarity com diferentes estipes que originam infeções do tracto urinário e seus pigmentos característicos neste meio cromogénico.....	63
Figura 12: Meio Brillance GBS com crescimento de colónias de <i>Streptococcus agalactiae</i>	71
Figura 13: Meio de Saboraud com Cloranfenicol e Gentamicina para crescimento de fungos.....	72
Figura 14: Representação do teste de CAMP para a identificação de <i>Streptococcus</i> do grupo B.....	75
Figura 15 : Meio Esculina Bilis com crescimento de <i>E. faecalis</i> . Precipitado de iões de ferro de cor preto-acastanhado à volta das colónias.....	77
Figura 16: Sistema de identificação Oxoid™ Microbact™ GNB Kit.	78
Figura 17: Esquema do imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA).....	83
Figura 18 : Seroconversão associada à infeção por CMV.....	87

ÍNDICE TABELAS

Tabela 1: Tipos de tubos, composição e valências onde são utilizados.....	22
Tabela 2: Equipamentos utilizados nas diferentes valências.	23
Tabela 3: Eritrócitos e principais causas de alterações nas suas contagens. [2].....	29
Tabela 4: Diagnóstico das anemias de acordo com o padrão morfológico	32
Tabela 5: Ângulos de medição dos sinais luminosos e características celulares avaliadas.	34
Tabela 6: Identificação diferencial dos leucócitos e causas das principais alterações nas suas contagens [3].....	34
Tabela 7: Plaquetas e principais causas de alterações nas suas contagens [3]......	36
Tabela 8: Valores correspondentes ao caso clínico I.....	40
Tabela 9: Valores correspondentes ao caso clínico II.....	42
Tabela 10: Valores correspondentes ao caso clínico III.	48
Tabela 11: Valores correspondentes ao caso clínico IV.....	49
Tabela 12: Classificação sanguínea segundo do Sistema AB0.....	51
Tabela 13: Tipagem de sanguínea segundo a classificação AB0/Rh.....	52
Tabela 14: Critérios para o diagnóstico de infeções urinárias de acordo com as guidelines da Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Doenças Infeciosas. (legenda: ufc –Unidades formadoras de colónias; WBC –leucócitos) [24]	64
Tabela 15: Valores correspondentes ao caso clínico V.....	79
Tabela 16: Interpretação dos resultados serológicos do CMV.	87
Tabela 17: Valores correspondentes ao caso clínico VI (A).....	93
Tabela 18: Valores correspondentes ao caso clínico VI (B).....	93
Tabela 19: Parâmetros determinados com mais frequência no sector de Bioquímica clínica.....	96
Tabela 20: Determinações imunológicas mais frequentes (exclui serologia infecciosa).....	98
Tabela 21: Marcadores tumorais solicitadas no LSJ [9].....	98
Tabela 22: Parâmetros da valência de Endocrinologia pedidos com maior frequência.....	99

ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEFA	<i>Asociación Española de Farmaceuticos Analistas</i>
AEQ	Avaliação Externa da Qualidade
Ag	Antigénio
AL	Anticoagulante lúpico
ALT/GPT	Alanina aminotransferase/glutamato piruvato transaminase
Anti-HBc	Anticorpo contra a cápside do HBV
Anti-HBs	Anticorpo contra o antigénio de superfície do HBV
aPTT	Tempo de tromboplastina parcial ativada
AST/GOT	Aspartato aminotransferase/glutamato oxaloacetato transaminase
BAAR	Bacilos ácido-álcool resistentes
BASO	Basófilos
BHI	Meio Brain Heart Infusion Broth
CCDA	<i>Campylobacter</i> Karmali Selective
ufc	Unidade formadora de colónias
CHAP	Meio de Chapman
CHGM	Concentração da hemoglobina globular média
CHOCV	Meio Chocolate Agar+Vitox
CMIA	Imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CHEMIFLEX™)
CMV	Citomegalovírus
CO₂	Dióxido de carbono
COLS+	Meio Columbia Agar+Sheep Blood Plus
CQE	Controlo de qualidade externo
CQI	Controlo de qualidade interno

DST	Doença sexualmente transmissível
EBNA	Anticorpos anti- antígeno nuclear de EBV
EBV	Epstain-Barr
EDTA-K₃	Ácido etilenodiaminotetracético tripotássico
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EOS	Eosinófilos
EQAS	<i>External Quality Assurance Services</i>
ESP	Esfregaço de sangue periférico
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FEIA	Imunoensaio fluoroenzimático
GBS	Meio Brillance GBS
GNB	Bacilos Gram negativo
GGT	Gamma-glutamil transferase
H₂O₂	Peróxido de hidrogénio
H₂S	Sulfureto de hidrogénio
HAV	Vírus da Hepatite A
Hb	Hemoglobina
HBsAg	Antígeno de superfície do HBV
HBV	Vírus da Hepatite B
HGM	Hemoglobina globular média
Hct	Hematócrito
HCV	Vírus da Hepatite C
HE	Meio Hektoen Enteric
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSV	Vírus Herpes simplex
IFI	Imunofluorescência indireta

Ig	Imunoglobulina
INR	<i>International Normalized Ratio</i>
IRF	Número de reticulócitos imaturos
ISI	<i>International Sensitivity Index</i>
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
IU	Unidades internacionais
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LDH	Lactato desidrogenase
LLC	Leucemia linfocítica crónica
LSJ	Laboratório São José
LYM	Linfócitos
MAPSS	<i>Multi-Angle Polarized Scatter Separation</i>
MO	Medula óssea
MONO	Monócitos
NaCl	Cloreto de sódio
NAD	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NEU	Neutrófilos
NLC	Normas para o Laboratório Clínico
PBS	<i>Phosphate buffer solution</i> (Tampão fosfato)
PDW	<i>Platelets distribution width</i>
PLT	<i>Platelets</i> (Plaquetas)
PROBIOQUAL	<i>Association pour la Promotion du Contrôle de Qualité en Biologie</i>
RBC	<i>Red blood cells</i> (Eritrócitos)
RDW	<i>Red distribution width</i>
RETIC	Reticulócitos
RIA	Radioimunoensaio
RLU	Unidades relativas de luz

RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RPR	<i>Rapid plasma reagin</i>
S/CO	<i>Signal to cut-off ratio</i>
SAB GC	Meio Sabouraud com gentamicina e cloranfenicol
SEHH	<i>Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia</i>
SNC	Sistema nervoso central
SPS	Polianetolsulfonato de sódio
TACSP	Técnicos de Análises Clínicas e Saúde Pública
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TP	Tempo de protrombina
TPHA	<i>Treponema pallidum hemagglutination</i>
TS	Técnicos Superiores
TSA	Teste de suscetibilidade a antimicrobianos
TT	Tempo de trombina
UK NEQAS	<i>United Kingdom National External Quality Assessment Service</i>
UTI	Meio Brilliance UTI Clarity
VCA	Anticorpos específicos anti-cápside de EBV
VGM	volume globular médio
VDRL	<i>Venereal disease research laboratory</i>
VS	Velocidade de sedimentação
WBC	<i>White blood cells</i> (Leucócitos)

I. INTRODUÇÃO

As análises clínicas são uma parte importante na prática clínica, já que, auxiliam no diagnóstico, prognóstico e implementação da terapêutica mais adequada.

É importante que a ligação entre os dados clínicos e os dados laboratoriais sejam utilizados de forma adequada e rentabilizando ao máximo os recursos disponíveis.

Sendo as análises clínicas uma área tão vasta e abrangente que está em constante crescimento com o aparecimento de novos testes e com recurso a novas metodologias, é fundamental que se aposte no conhecimento de modo a retirar o máximo benefício.

É de extrema importância que todo o processo que compreende o exame laboratorial decorra sem fatores que perturbem o resultado final das nossas determinações. Para tal, é necessário que todas as variáveis que decorrem na fase pré-analítica, analítica e pós-analítica sejam tidas em consideração de forma a obter resultados precisos e fiáveis, que forneçam ao clínico os dados necessários e adequados ao contexto que desencadeou a solicitação.

O estágio curricular do Mestrado de Análises Clínicas decorreu no Laboratório São José, sob orientação do Dr. Paulo João Soares, Diretor Técnico do laboratório. Nos esclarecimentos relativos à realização do relatório de estágio, contei com o apoio da Professora Doutora Ana Miguel Matos, minha orientadora interna da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Apesar de ter tido contacto com todas as valências que o Laboratório São José possui, incidi essencialmente nas valências de Hematologia e Microbiologia, áreas com as quais apenas tinha tido contacto durante o meu percurso académico. Estas duas valências são muito vastas e de extrema importância na clínica. Apesar de adquirirmos conhecimentos teóricos que são o nosso ponto de partida e que devem ser utilizados no decurso da nossa atividade profissional, a realidade é que a experiência do dia-a-dia nos ajuda a cimentar estes conhecimentos e contribui para a melhoria da nossa atividade. A bagagem teórica que trazemos é muito importante, mas a prática faz de nós melhores profissionais, leva-nos a procurar a melhor forma de executar as nossas funções e lança-nos novos desafios. Só fazendo é que percecionamos as verdadeiras dificuldades e simultaneamente aprendemos.

O tempo de estágio é sempre curto para aprender áreas tão vastas, todos os dias são novos desafios e cabe a cada um de nós assegurar que possuímos capacidade para os enfrentar e sobretudo, prestar um serviço de qualidade aos utentes que confiam no nosso profissionalismo.

2. DESCRIÇÃO DO SERVIÇO

O Laboratório São José existe há mais de 40 anos e está atualmente sediado no piso 0 do edifício IDEALMED UHC – Unidade Hospitalar de Coimbra.

O laboratório possui um horário de funcionamento de segunda a sábado (das 7h30 às 20h30 de segunda a sexta-feira e das 9h às 12h aos sábados). Disponibiliza também os seus serviços de urgência 24h por dia, os 7 dias da semana.

O laboratório funciona com vários postos de colheita no concelho de Coimbra (IDEALMED, Rua dos Combatentes, Pedrulha, CLIMAG, Ceira), assim como, postos em Semide, Miranda do Corvo, Figueira da Foz e Louriçal. Para além destes postos de colheita, o laboratório também disponibiliza, mediante marcação prévia, a possibilidade de realizar as colheitas aos utentes no respetivo domicílio. Também chegam ao laboratório amostras provenientes de locais com os quais existem protocolos, como por exemplo as Residências Montepio, da própria IDEALMED UHC, nomeadamente dos serviços de Internamento, Oncologia, Maternidade, Atendimento médico permanente e da Ferticentro (unidade de medicina de reprodução), assim como, de outros laboratórios da região.

Tem como Diretor Técnico o Dr. Paulo João Soares, licenciado em Ciências Farmacêuticas e Especialista de Análises Clínicas pela Ordem dos Farmacêuticos. Conta também com uma equipa constituída por pessoas com distintas formações, nomeadamente pessoal Administrativo, Enfermeiros, Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica (Análises Clínicas – TACSP), Farmacêuticos (Técnicos Superiores – TS) e Assistentes Operacionais.

São várias as valências técnicas que o laboratório dispõe para a análise de amostras biológicas, nomeadamente: Bioquímica, Hematologia, Microbiologia, Imunologia e Serologia, Endocrinologia laboratorial, Monitorização de fármacos e Toxicologia clínica e Patologia molecular.

Diariamente são recebidas uma média de 150 a 200 amostras. Estas amostras são colhidas na sua generalidade pelos Enfermeiros, TACSP e TS, com exceção para as amostras de urina e fezes que são colhidas pelo próprio utente.

O LSJ possui dupla certificação: ISO 9001:2008 e Normas para o Laboratório Clínico NLC:2003, e procura manter a excelência em todas as fases (pré-analítica, analítica e pós-analítica) das análises que realiza.


Uma das fases fundamentais em todo o processo analítico é a fase pré-analítica. Esta fase começa com a receção e registo dos pedidos solicitados pelo clínico. Neste primeiro



contacto entre o utente e o laboratório é fundamental que a este lhe seja explicada de forma clara e rigorosa quais as condições necessárias para efetuar a colheita da amostra de forma adequada, de modo a que os resultados obtidos a partir das mesmas sejam o mais fiáveis possíveis.

Durante a inscrição do utente, o sistema informático gera um código de barras que vai identificar a(s) amostra(s) e a requisição com uma referência interna única e específica e que fica associado ao processo do utente.

Já na sala de colheitas onde se procede à colheita das amostras, é fundamental que seja confirmada a identificação do utente, assim como, assegurar que este cumpriu com as recomendações específicas consoante as análises solicitadas. Se estão reunidas as condições necessárias, as colheitas serão feitas consoante a natureza do produto para os respetivos tubos e/ou contentores que foram previamente identificados com os códigos de barras gerados no momento da inscrição. Para amostras biológicas de sangue venoso, consoante o tipo de amostra analítica que é necessário obter, utiliza-se tubos de colheita contendo no seu interior composições específicas (**Tabela I**), que deverão ser colhidos segundo uma ordem específica, para evitar possíveis interferências dos seus vários componentes que comprometam a precisão e exatidão dos resultados.

Tabela I: Tipos de tubos, composição e valências onde são utilizados.

Ordem	Tubo	Composição	Amostra analítica	Aplicação
1º		Meio de cultura (tripticase de soja, SPS, entre outros)	Sangue total	Microbiologia
2º		Esferas de poliestireno ativadoras da coagulação	Soro	Bioquímica Imunologia
3º		Citrato de sódio (1:9)	Plasma	Coagulação
4º		Heparina lítio	Plasma	Bioquímica

Ordem	Tubo	Composição	Amostra analítica	Aplicação
5°		EDTA-K ₃	Sangue total	Hematologia Bioquímica
6°		Citrato de sódio (1:4)	Sangue total	Velocidade de sedimentação

Após a colheita, as amostras são rececionadas no laboratório e triadas, de forma a verificar que cumprem todos os requisitos necessários para o seu processamento. Se porventura se verificar que a amostra apresenta algumas condicionantes que obriguem à sua rejeição (amostra mal identificada, tubo inadequado para a determinação pretendida, volume incorreto de amostra, amostra com coágulos, entre outras) esta deve ser inutilizada e solicitada uma nova amostra, de modo a evitar erros e resultados inadequados.

Consoante o tipo de amostra e a análise pedida, esta deverá ser tratada, processada e acondicionada, segundo os critérios do laboratório.

A automatização é transversal à maioria das valências do laboratório, gerando rapidez e eficácia na resposta, o que é uma mais valia dado ao elevado número de amostras. O facto de haver menos técnicas manuais, onde o manuseamento de amostras é maior, contribui para minimizar os erros. No entanto, existem áreas no laboratório, como por exemplo a Microbiologia, onde todo o processo é manual, exigindo grande competência teórica e técnica. Os equipamentos utilizados nas diferentes valências estão apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2: Equipamentos utilizados nas diferentes valências.

Valência	Equipamento	Amostra analítica utilizada	Método
Bioquímica/Toxicologia	ARCHITECT c8000	Plasma (Heparina, EDTA K ₃ , Citrato); Soro; Urina, Sangue total (EDTA K ₃), LCR	Espectrofotometria; Turbidimetria; Potenciometria
Hematologia	Cell-Dyn 3700	Sangue total (EDTA K ₃)	Espectrofotometria; Impedância elétrica; Citometria de fluxo
	LENA	Sangue total (Citrato de sódio 1:4)	Westergren modificado

Valência	Equipamento	Amostra analítica utilizada	Método
	Sysmex CA-1500	Plasma (Citrato de sódio 1:9)	Turbidimetria
	Sebia Hydrasis	Sangue total	Eletroforese
Imunologia/Endocrinologia	ARCHITECT i2000SR	Plasma (Heparina, EDTA K ₃ , Citrato); Soro; Urina, Sangue total (EDTA K ₃), LCR	CHEMIFLEX™ (Imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência)
	ARCHITECT i1000SR		
	ImmunoCAP	Soro	Imunoensaio fluorencimático (FEIA)
	Sebia Hydrasis	Soro	Eletroforese

Caso sejam solicitadas análises que não se realizem no LSJ, as amostras podem ser colhidas, devidamente acondicionadas e enviadas, de forma a serem processadas por laboratórios externos com os quais o LSJ tem parcerias, o que resulta numa mais-valia para os utentes.

Toda a fase analítica é precedida da execução periódica (diária ou semanal) de controlos de qualidade internos (CQI), independentemente de se tratarem de equipamentos automatizados ou técnicas manuais. Os resultados dos CQI devem-se situar dentro de um intervalo-alvo de valores, garantindo assim, que os resultados das nossas amostras são fiáveis e foram obtidos sob condições técnicas adequadas. O laboratório também participa em programas de avaliação externa da qualidade (AEQ) que permitem a monitorização dos resultados laboratoriais (ver Capítulo 3).

Finalmente, os resultados são validados biopatologicamente pelo Diretor Técnico, tendo em conta o histórico disponível (caso ele exista), assim como, a situação clínica indicada pelo clínico requisitante.

As amostras de sangue total, plasma e soro no fim do seu processamento são armazenadas durante um determinado período de tempo em *racks* do sistema indexor, sistema que funciona como um armazenador de amostras. O código de barras da amostra é lido e a amostra é colocada numa posição à escolha na *rack* de armazenamento. O sistema indexor identifica o local onde a amostra foi colocada e caso seja necessário localizar de novo a amostra, apenas será necessário identificar o número da mesma que o sistema indica o número da *rack* e a respetiva posição.

3. CONTROLO DE QUALIDADE

É de extrema importância assegurar que todos os resultados obtidos são fidedignos. O laboratório realiza periodicamente dois tipos de controlo, o controlo de qualidade interno e o controlo de qualidade externo, de forma a monitorizar o desempenho do processo analítico e avaliar a exatidão dos seus resultados.

3.1. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

O controlo de qualidade interno permite monitorizar a reprodutibilidade analítica e verificar a precisão dos resultados.

São utilizados controlos fornecidos pelas casas comerciais cujos valores-alvo e respetivos desvios-padrão são conhecidos. Normalmente são utilizados um nível de controlo normal e um ou dois níveis considerados patológicos (alto ou baixo), usados de forma alternada ou em simultâneo, consoante o analito que pretendemos avaliar. Para determinações qualitativas, os fabricantes fornecem controlos reativos e controlos não reativos, que devem ser utilizados preferencialmente uma vez em cada série de amostras. Há parâmetros que são avaliados diariamente e outros semanalmente, mas tudo está previamente definido conforme a frequência com que as determinações são solicitadas, assim como, da estabilidade dos reagentes utilizados. Nos respetivos equipamentos estão introduzidas as cartas de Levey-Jennings, cabendo ao Diretor Técnico otimizar as cartas de controlo, mediante a verificação da variação dos resultados obtidos, tendo em consideração o equipamento e o método utilizado. Caso os controlos ultrapassem os valores limite, assim como, se se verificar após análise dos resultados nas respetivas cartas-controlo face às regras de Westgard que o processo analítico não está em conformidade, deverão ser tomadas medidas corretivas adequadas. É preciso ter a noção que são múltiplas as fontes de erro (reagentes que perdem estabilidade, falha do equipamento, contaminação, falhas do operador, entre outras), por isso, deve-se utilizar uma abordagem lógica para a resolução do problema.

É muito importante que todas as determinações analíticas estejam corretamente calibradas nos respetivos equipamentos. Os calibradores são soluções com quantidades conhecidas dos parâmetros que pretendemos analisar. A calibração gera uma curva de calibração que vai permitir a exatidão dos resultados obtidos nas nossas determinações, devendo ser realizada sempre que há mudança de lote ou quando os valores do controlo de qualidade estão sistematicamente afetados.

3.2. AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE

A necessidade de monitorizar resultados e obter valores comparáveis ao longo do tempo, independentemente do método/equipamento utilizado, leva a que o LSJ participe em vários programas de controlo de qualidade externo. Estes programas permitem avaliar a exatidão dos resultados, apresentando benefícios ao nível da comparabilidade, uniformidade e melhoria do desempenho. Estes programas são cíclicos e estão calendarizados ao longo do ano. A entidade organizadora do programa envia amostras cujos resultados para os parâmetros em estudo são desconhecidos para os seus participantes. Alguns dos programas nos quais o laboratório participa são:

- AEFA (*Asociación Española de Farmaceuticos Analistas*) e UK NEQAS (*United Kingdom National External Quality Assessment Service*) – Microbiologia;
- PROBIOQUAL (*Association pour la Promotion du Contrôle de Qualité en Biologie*) – Bioquímica, Hematologia, Hemostase, Imunologia, Marcadores tumorais, HbA_{1C}, Serologia;
- SEHH (*Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia*) – Hematologia e Hemostase;
- EQAS (*External Quality Assurance Services*) – Hematologia.

Os resultados obtidos no laboratório para as amostras controlo são enviados para a entidade organizadora destes programas, que analisa os resultados e prepara o respetivo relatório que deverá ser enviado posteriormente a todos os participantes. Cabe ao Diretor Técnico, após a chegada do relatório, avaliar os resultados e fazer os devidos ajustes, casos os valores obtidos não coincidam com os valores de consenso inter-laboratorial.

4. SECTOR DE HEMATOLOGIA

O sangue é um tecido líquido que está em estreita comunicação com todas as células do nosso organismo graças a uma ampla rede de vasos. É constituído essencialmente por eritrócitos, leucócitos e plaquetas que estão suspensos num fluido denominado por plasma.

Entre as suas funções a que mais se destaca é a do transporte de oxigénio pela hemoglobina contida nos eritrócitos, assim como, nutrientes e produtos do metabolismo que necessitem de ser armazenados ou eliminados. Também tem a função de defesa exercida pelos leucócitos e prevenção da hemorragia pela ação das plaquetas e fatores da coagulação.

Todas as células sanguíneas maduras derivam de uma célula-mãe hematopoiética. Esta célula-mãe tem capacidade de autorrenovação e é pluripotente, isto é, tem capacidade de diferenciação. Esta diferenciação ocorre na medula óssea através de mediadores solúveis (citocinas) e sinais de contacto emitidos pelas células do estroma e outras células acessórias, que criam um microambiente propício para que ocorra a hematopoiese.

As células progenitoras mielóides dão origem aos *megacarioblastos* precursores dos *megacariócitos*, células grandes e multinucleadas que quando se dividem dão origem às plaquetas; *eritroblastos*, que se diferenciam em eritrócitos; *mieloblastos*, que diferenciam em neutrófilos, eosinófilos e basófilos (células com núcleo segmentado e por isso chamadas de polimorfonucleares), assim como, *monoblastos*, precursores dos monócitos (células mononucleares). As células progenitoras linfóides dão origem aos *linfoblastos*, que se podem diferenciar em linfócitos T (responsável pela resposta imune celular) e linfócitos B (responsáveis pela resposta imune humoral, pela produção de anticorpos) [1].

A regulação da hematopoiese é essencial para o equilíbrio ao nível da manutenção de uma *pool* constante de células hematopoiéticas, assim como, adaptação às necessidades do organismo.

As células que circulam no sangue, em sua grande maioria, já atingiram a sua máxima diferenciação, sendo incapazes de novas divisões celulares.

Conhecer as causas que levam às alterações quantitativas e/ou qualitativas dos diferentes tipos de células presentes no sangue periférico é essencial no diagnóstico de diversas patologias.

O LSJ realiza várias determinações que permitem avaliar quantitativamente e qualitativamente as células sanguíneas, entre as quais podemos destacar o hemograma, contagens celulares na câmara de Neubauer, observação do esfregaço de sangue periférico,

velocidade de sedimentação e eletroforese de hemoglobina. Também são realizados estudos da hemostase, destacando as determinações dos tempos de coagulação, quantificação de fibrinogénio e D-dímeros. Outras determinações no âmbito da hemostase (doseamento de fatores da coagulação, por exemplo) também podem ser requisitadas, mas nesses casos o LSJ tem um protocolo de colaboração com um laboratório parceiro onde estas determinações são realizadas. Neste sector, também são realizadas a determinação do grupo sanguíneo AB0/Rh, assim como, o teste de Coombs direto e indireto.

4.1. HEMOGRAMA

É dos exames mais solicitados ao nível laboratorial, pois fornece informações relevantes que auxiliam o clínico tanto no diagnóstico, como na monitorização de várias patologias.

Compreende a determinação de um conjunto de parâmetros entre os quais se incluem as contagens dos elementos figurados do sangue (eritrócitos, leucócitos, plaquetas, e se solicitado, também reticulócitos), cálculo de índices eritrocitários, doseamento da hemoglobina e a razão entre o número de eritrócitos e o volume que ocupam no plasma (hematócrito), índices plaquetários, assim como, determinação do diferencial dos leucócitos nas suas 5 subpopulações.

É efetuado a partir de uma amostra de sangue venoso, colhida para um tubo revestido com anticoagulante. O anticoagulante utilizado para o hemograma é o ácido etilenodiaminotetracético tripotássico (EDTA-K₃). O EDTA-K₃ funciona como um quelante dos iões de cálcio, evitando a agregação plaquetar e interrompendo a cascata da coagulação, para além de preservar a morfologia celular [2].

No LSJ os hemogramas são realizados no contador hematológico automatizado Cell-Dyn 3700.

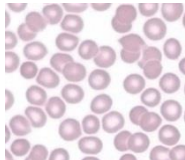
Este contador utiliza 3 técnicas diferentes ao longo de vários canais para reduzir ao máximo possíveis interferentes e desta forma obter os diferentes parâmetros hematológicos. Estas técnicas são impedância elétrica, citometria de fluxo com tecnologia MAPSS (*Multi-Angle Polarized Scatter Separation*) e espectrofotometria [3]. Estes métodos irão sendo abordados à medida que for introduzindo os diferentes parâmetros.

4.1.1 ERITRÓCITOS

A contagem da série vermelha no equipamento Cell-Dyn 3700 é feita por impedância elétrica num canal próprio. Este canal é o mesmo que é utilizado para a contagem das plaquetas.

O princípio do método consiste em diluir a amostra com uma solução eletrolítica isotônica. A seguir, a mistura é encaminhada para um canal elétrico, sendo aspirada através de uma pequena abertura onde é aplicada uma corrente elétrica constante entre dois eletrodos de cargas opostas. As células sanguíneas apresentam uma fraca condutividade elétrica relativamente à solução eletrolítica onde se encontram. Quando cada célula passa através da abertura, gera uma mudança na resistência elétrica, produzindo um pulso elétrico, pulso este que é detectado, amplificado e registrado. O número de pulsos vai ser diretamente proporcional à quantidade de células que passam pela abertura, enquanto que a amplitude dos pulsos é proporcional ao volume celular. O equipamento fornece para além da contagem em número absoluto (**Tabela 3**), histogramas da distribuição por volume celular [3].

Tabela 3: Eritrócitos e principais causas de alterações nas suas contagens. [2]

Eritrócitos	Imagem no ESP	Alterações nas contagens (causas)
Forma arredondada e bicôncava. <i>Diâmetro:</i> 7,5µm <i>Núcleo:</i> ausente. <i>Citoplasma:</i> acidófilo. Coloração rosa derivada pela presença de hemoglobina. <i>Função:</i> assegurar o estado funcional da hemoglobina.		<u>Eritrocitose</u> Policitemia vera, desidratação severa, doenças pulmonares, outros. <u>Eritropenia</u> Anemia, hemorragia, hipervolemia

A contagem de eritrócitos é determinada de uma forma direta e expressa em valor absoluto pela seguinte equação:

$$RBC = \text{número} \times 10^{12} \text{ células/L ou número} \times 10^6 \text{ células/}\mu\text{L}$$

O volume globular médio (VGM), corresponde a um dos índices eritrocitários que são avaliados no hemograma. Pelo método da impedância elétrica este valor é determinado de forma direta, já que, vai derivar da média da distribuição do tamanho gerada durante a

contagem dos eritrócitos, que como foi referido anteriormente, correspondia à amplitude dos pulsos medidos [3]. Esta medida é expressa em fentolitros (fL). Este parâmetro permite classificar os eritrócitos em microcíticos, macrocíticos ou normocíticos [2].

A variabilidade de tamanho dos eritrócitos é dada pelo RDW. Este parâmetro corresponde a um coeficiente de variação de volume dos eritrócitos que foram contados e é determinado de forma direta a partir da distribuição das amplitudes dos pulsos medidos. Este coeficiente é indicativo de anisocitose e é apresentado em percentagem.

O hematócrito (Hct) é a relação entre o volume ocupado pelos eritrócitos e o volume total do sangue [3]. Este valor é dado em percentagem e pode ser calculado a partir do VGM e do número de eritrócitos pela equação:

$$Hct (\%) = [RBC (\times 10^{12}/L) \times VGM (\times 10^{-15}/L)] \times 100$$

A hemoglobina é a hemoproteína presente nos eritrócitos que permite o transporte de oxigénio e dióxido de carbono. É constituída por 4 cadeias polipeptídicas (cadeias de globina) e 4 grupos heme que contém ferro. Podemos classificar a hemoglobina consoante a sua constituição de globinas. A hemoglobina A (HbA) é constituída por 2 cadeias de globina α e 2 cadeias de globina β , e corresponde entre 85-95% da hemoglobina total. Também existe a hemoglobina (HbA₂) e a hemoglobina F (HbF) que correspondem a menos de 3,5% e 1% da hemoglobina total, respetivamente. A HbA₂ é constituída por 2 cadeias α e 2 cadeias δ e a HbF constituída por 2 cadeias α e 2 cadeias γ . Variações estruturais, isto é, qualitativas nas cadeias de globina levam a hemoglobinopatias, enquanto variações quantitativas originam talassémias [8][13].

A determinação da concentração de hemoglobina é feita por espectrofotometria no mesmo canal que mede a impedância dos leucócitos. Após diluição da amostra, é adicionado um reagente (imidazola) que vai lisar os eritrócitos e converter a hemoglobina num complexo cromogénico estável que absorve a luz a 540 nm. Um fotodetetor mede a quantidade de luz que passa através da amostra diluída, sendo a concentração de hemoglobina na amostra tanto maior, quanto maior for a absorvância [3]. O valor de hemoglobina é expresso em gramas de hemoglobina por decilitro de sangue total (g/dL).

Existem outros parâmetros eritrocitários que são determinados por cálculo, ou seja, duma forma indireta e a partir de alguns dos parâmetros que foram introduzidos anteriormente. Estes parâmetros são a hemoglobina globular média (HGM) e concentração da hemoglobina globular média (CHGM).

A hemoglobina globular média (HGM) é o valor médio de hemoglobina contida em cada eritrócito. É expresso em picogramas (pg) e é obtido a partir da relação entre o valor de hemoglobina total e o número de eritrócitos. Este parâmetro permite classificar os eritrócitos em hipocrômicos, hiperocrômicos ou normocrômicos e é calculado pela expressão:

$$HGM (pg) = [Hemoglobina (g/dL) / RBC \times 10^6 / \mu L] \times 10$$

Finalmente, a concentração da hemoglobina globular média (CHGM) corresponde à massa de hemoglobina reportada ao volume dos eritrócitos. Este parâmetro é expresso em gramas por decilitros (g/dL) e dado pela seguinte equação:

$$CHGM (g/dL) = [Hemoglobina (g/dL) / Hct (\%)] \times 100$$

4.1.2 RETICULÓCITOS

Os reticulócitos são eritrócitos imaturos que apesar de já não apresentarem núcleo, ainda contém RNA ribossômico, permanecendo no sangue periférico entre 24 a 48h até maturarem. Este RNA vai precipitar formando retículos na presença de certos corantes, permitindo assim a sua contagem. No LSJ é usado o azul de metileno novo, corante que a Abbott fornece num tubo próprio de contagem de reticulócitos. Para este tubo deve pipetar-se um volume predefinido de sangue total colhido em EDTA-K₃ (20μL) e deixar incubar durante 15 minutos à temperatura ambiente, de modo a permitir que o corante se ligue ao RNA. A contagem destes elementos é feita por contagem ótica por citometria de fluxo (ver explicação da técnica no capítulo 4.1.3), sendo o resultado dado em número absoluto, mas também em percentagem de reticulócitos (%), que resulta do quociente entre o número absoluto de reticulócitos e o número de eritrócitos que foram previamente contabilizados no hemograma [3]. Nem todos os reticulócitos apresentam o mesmo grau de maturação, sendo os mais imaturos aqueles que apresentam maior quantidade de precipitados. O Cell-Dyn 3700 fornece também informação sobre o número de reticulócitos imaturos (IRF).

$$RETIC = número \times 10^3 células/\mu L$$

A contagem de reticulócitos permite estimar a taxa de produção de eritrócitos pela medula óssea. O aumento de reticulócitos verifica-se em situações de anemia hemolítica, hemorragia, doentes sob terapêutica para corrigir a anemia, ou gravidez. Uma contagem

reduzida em doentes com anemia pode surgir em condições em que a hematopoiese está a ser ineficaz.

A anemia é uma síndrome que se caracteriza pela redução da concentração da hemoglobina ou diminuição da proporção de eritrócitos, quando relacionados com os valores normais previamente estabelecidos em pessoas saudáveis. É muito importante conhecer quais os valores de normalidade previamente estabelecidos para pessoas da mesma faixa etária, género e raça. A contagem do número de eritrócitos, determinação da concentração de hemoglobina, índices eritrocitários, assim como, a contagem dos reticulócitos são uma mais-valia na condução do diagnóstico etiológico da anemia (**Tabela 4**) [2] [13] [18].

Tabela 4: Diagnóstico das anemias de acordo com o padrão morfológico.

Classificação morfológica	Causas
Microcíticas e Normocrómicas <i>VGM < 80 fL</i> <i>HGM: 27- 33 pg</i>	Deficiência de ferro (precoce), β -talassémia minor, anemia por doença crónica.
Microcíticas e Hipocrómicas <i>VGM < 80 fL</i> <i>HGM < 27 pg</i>	Deficiência de ferro (tardia), α -talassémia, β -talassémia intermédia ou major, anemia sideroblástica congénita, anemia por doença crónica, intoxicação por chumbo, outras.
Normocítica e Normocrómica <i>VGM: 80-95 fL</i> <i>HGM: 27- 33 pg</i>	Infiltração da medula óssea, hemólise, anemia aplásica, anemia por doença crónica, anemia por insuficiência renal, hemorragia.
Macrocítica <i>VGM > 95 fL</i>	Deficiência de vitamina B ₁₂ e/ou folato, doença hepática, alcoolismo, síndromes mielodisplásicas, hemorragia, hemólise, hipotireoidismo, algumas drogas.

Existem várias alterações que podemos identificar nos eritrócitos quando observados no esfregaço de sangue periférico (ESP) (ver modo de execução e observação do ESP no Capítulo 4.3). Estas alterações podem ser ao nível do tamanho, da coloração (policromasia – variação da cor), da forma (poiquilocitose – variação da forma). As formas mais comuns são: esferócitos, eliptócitos, dacriócitos, equinócitos, acantócitos, células em alvo, drepanócitos, estomatócitos, esquizócitos), ou ao nível das inclusões (corpos de Howell-Jolly, pontilhado basófilo, corpúsculos de Pappenheimer, anéis de Cabot). É necessário também estar atentos à presença de eritroblastos circulantes, assim como, à aglutinação de eritrócitos formando *roleaux* ou rosetas [2].

4.1.3 LEUCÓCITOS

A contagem de leucócitos no Cell-Dyn 3700 resulta da combinação da contagem por impedância elétrica com a contagem ótica por citometria de fluxo. Na contagem ótica é utilizada a tecnologia MAPSS (*Multi-Angle Polarized Scatter Separation*). A tecnologia MAPSS consiste na combinação de sinais de dispersão da luz que permitem diferenciar e agrupar as células segundo as suas características, isto é, segundo tamanho e complexidade [3][15]. Logo, a contagem dos leucócitos inclui o seu número absoluto, assim como, o diferencial dos mesmos nas suas várias populações (neutrófilos (NEU), linfócitos (LYM), monócitos (MONO), eosinófilos (EOS) e basófilos (BASO)). A contagem diferencial é dada tanto número absoluto, como em percentagem (%).

$$\text{WBC} = \text{número} \times 10^9 \text{ células/L ou número} \times 10^3 \text{ células}/\mu\text{L}$$

A amostra é previamente tratada com um reagente específico que lisa os eritrócitos, desta forma, estes não interferem nas contagens dos leucócitos. De seguida a amostra é injetada por fluxo laminar de modo a que as células fiquem alinhadas uma a uma, de modo a interatuar com a luz do laser individualmente (Figura 1)

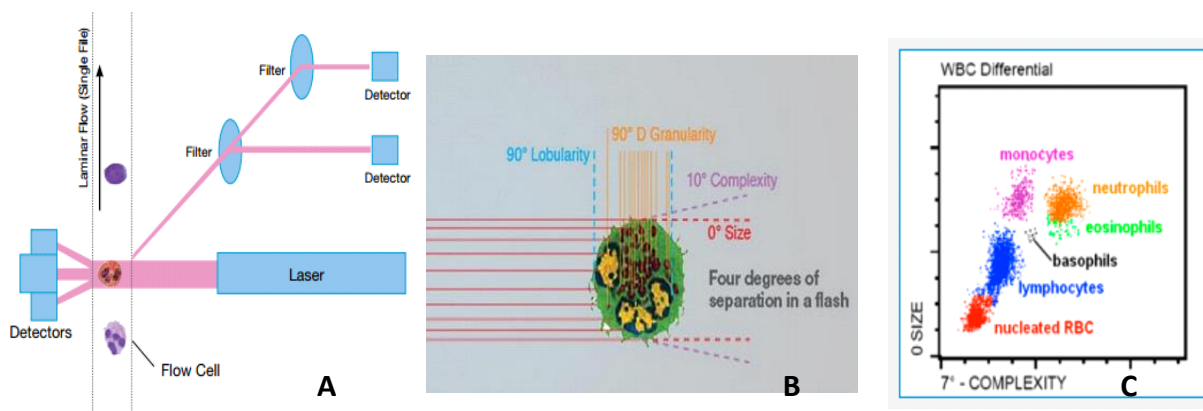


Figura 1: Método de contagem e diferenciação dos leucócitos pela tecnologia MAPSS - A: Princípio de contagem ótica de células por medição de luz refratada (citometria de fluxo); B: Características celulares e ângulos de medição; C: Histograma do diferencial de WBC gerado pela combinação de sinais de dispersão.¹

¹ A: Adaptado: <http://www.medical-labs.net/automated-cell-counting-based-on-optical-technology-optical-principle-3173/>

B: Adaptado: <https://www.corelaboratory.abbott/int/en/offerings/brands/cell-dyn/cell-dyn-ruby>

C: Fonte: HOFMANN, J.J.M.L.; VILLARRUBIA, J.; VAN DUN, L. Cell-Dyn Sapphire -Hematology Monograph series. Volume 4, Abbot Diagnostics Division, 2012.


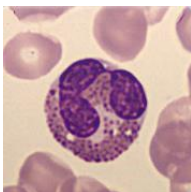
A intensidade de luz refratada é medida sob 4 ângulos (**Tabela 5**):

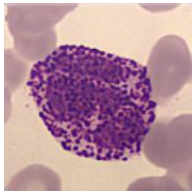
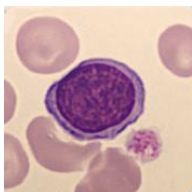
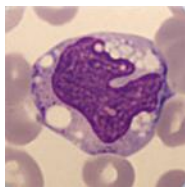
Tabela 5: Ângulos de medição dos sinais luminosos e características celulares avaliadas.

Ângulo	Características celulares avaliadas
0°	Volume celular
10°	Complexidade da estrutura celular (estrutura interna)
90°	Granularidade interna e segmentação nuclear (lobularidade)
90° despolarizado	Granularidade dos eosinófilos

Caso se verifiquem grupos de células com características anômalas durante a contagem e diferenciação, o equipamento gera um conjunto de alarmes, como por exemplo blastos, linfócitos atípicos, eritroblastos ou granulócitos imaturos, aos quais deveremos estar atentos e confirmar pela visualização do esfregaço de sangue periférico (ESP). Quando observamos os leucócitos no ESP devemos avaliar a forma dos seus núcleos, a presença de nucléolos, aparência da cromatina, características das suas granulações e presença de vacúolos (**Tabela 6**).

Tabela 6: Identificação diferencial dos leucócitos e causas das principais alterações nas suas contagens [3].

Leucócitos		Imagem no ESP	Alterações nas contagens (causas)
Polimorfonucleares	Neutrófilos		<p><u>Neutropenia</u> Produção diminuída pela MO, infecções virais, infecções bacterianas graves, fármacos, doenças autoimunes.</p> <p><u>Neutrofilia</u> Infecções bacterianas, tratamento com fatores de crescimento, processos inflamatórios, neoplasias, doenças metabólicas.</p>
	Eosinófilos		<p><u>Eosinofilia</u> Reações alérgicas, infecções provocadas por parasitas.</p>

Leucócitos		Imagem no ESP	Alterações nas contagens (causas)
Mononucleares	Basófilos	<p>mediadores da resposta alérgica.</p> <p><u>Diâmetro</u>: 10- 14µm <u>Citoplasma</u>: acidófilo, com granulações preto-purpúreas que ocupam todo o citoplasma e se sobrepõe ao núcleo e são ricas em heparina e histamina. <u>Núcleo</u>: lobulado (2 a 3) com cromatina densa e irregular. <u>Função</u>: resposta alérgica.</p>	 <p><u>Basofilia</u> Reações alérgicas. Leucemia mieloide crónica.</p>
	Linfócitos	<p><u>Diâmetro</u>: 10- 16µm <u>Citoplasma</u>: escasso e levemente basófilo, com poucas granulações azurófilas. <u>Núcleo</u>: redondo, ligeiramente indentado e cromatina condensada. Nucléolos invisíveis. <u>Função</u>: especificidade na resposta imunológica. Defesa contra vírus.</p>	 <p><u>Linfocitopenia</u> Insuficiência grave da MO, síndromes de imunodeficiência, tratamento com imunodepressores. <u>Linfocitose</u> Comum em crianças Infeções virais Patologias linfoproliferativas, como a leucemia linfocítica crónica (LLC).</p>
	Monócitos	<p><u>Diâmetro</u>: 12- 20µm <u>Citoplasma</u>: basófilo, com grânulos azurófilos finos. Pode apresentar vacúolos. <u>Núcleo</u>: grande e irregular, de forma variada, com cromatina fina e distribuída uniformemente. <u>Função</u>: fagocítica. Apresentação de antígenos aos linfócitos.</p>	 <p><u>Monocitose</u> Infeções bacterianas crónicas: tuberculose, brucelose, endocardite bacteriana, febre tifoide. Leucemia mielomonocítica crónica Doenças do tecido conectivo Doenças autoimunes Infeções por protozoários.</p>

4.1.4 PLAQUETAS

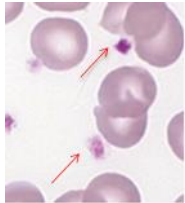
Como já foi referido, a contagem de plaquetas no Cell-Dyn 3700 é feita no mesmo canal onde é feita a contagem dos eritrócitos, usando a técnica de impedância elétrica. A separação é feita consoante o tamanho, e os pulsos contados que correspondam às

partículas com volume entre os 1-35 fentolitros (fL) são incluídos nas plaquetas (**Tabela 7**). Os resultados são expressos em número absoluto.

$$PLT = \text{número} \times 10^3 \text{ células}/\mu\text{L}$$

Assim como nos eritrócitos o volume era determinado pela amplitude dos pulsos contados, as plaquetas também podem ser caracterizadas pelo seu volume plaquetar médio (VPM) expresso em fentolitros (fL) e pela sua heterogeneidade, isto é, pelo índice de dispersão do volume plaquetar (PDW), que resulta do seu coeficiente de variação, dado em percentagem.

Tabela 7: Plaquetas e principais causas de alterações nas suas contagens [3].

Plaquetas	Imagem no ESP	Alterações nas contagens (causas)
<p><u>Diâmetro:</u> 1,5- 3µm</p> <p><u>Citoplasma:</u> grânulos azurófilos finos dispersos no citoplasma ou concentrados no centro</p> <p><u>Núcleo:</u> ausente.</p> <p><u>Função:</u> participar junto com os fatores da coagulação na hemóstase.</p>		<p><u>Trombocitopenia</u></p> <p>Trombocitopenia autoimune, hiperesplenismo, sépsis, infeções virais, coagulação intravascular disseminada, induzida por drogas, transfusões, outras.</p> <p>Devemos excluir: aglutinação das plaquetas pela colheita com EDTA (pseudotrombocitopenia), plaquetas gigantes, contagem elevada de eritrócitos, satelitismo plaquetar, microcoágulos (observar ESP).</p> <p><u>Trombocitose</u></p> <p>Trombocitemia essencial, algumas doenças mieloproliferativas, inflamação.</p>

4.2. CONTAGENS NA CÂMARA DE NEUBAUER

A contagem de células sanguíneas na câmara de Neubauer no LSJ é feita essencialmente para confirmar situações em que as contagens dadas pelo analisador automático não coincidam com a clínica do paciente, ou sejam pouco coerentes, como acontece quando existe um reduzido número de eritrócito e/ou plaquetas e não exista coágulo, pelo menos visível, por exemplo. Também podemos auxiliar-nos desta contagem em situações de intensa leucopenia/leucocitoses, onde o analisador perde alguma linearidade.

Para tal, utilizam-se pipetas específicas, que irão aspirar um volume predefinido de sangue total colhido em EDTA-K₃ e que vai ser diluído com diluentes específicos que variam consoante as células que se queiram analisar.

A câmara enche-se com a diluição e é observada no microscópio ótico na objetiva de 40x. A câmara de Neubauer apresenta um retículo com uma série de quadrados com áreas distintas. Consoante o tipo de célula que queiramos contar, deveremos escolher os quadrados correspondentes. A seguir, o número de células contadas, o fator de diluição, a área da superfície contada e o volume da câmara são utilizados para efetuar os cálculos e expressar o resultado da contagem.

4.3. ESFREGAÇO DE SANGUE PERIFÉRICO

O esfregaço de sangue periférico no LSJ é realizado a partir da amostra usada para o hemograma (sangue total colhido com EDTA-K₃) quando é requisitado pelo clínico ou quando é necessário esclarecer contagens do autoanalisador onde são detetadas algumas alterações suspeitas.

É imprescindível que o ESP seja tecnicamente bem feito, com zonas de leitura definidas, assim como, bem corado. Só desta forma é possível proceder a uma correta avaliação e detetar eventuais alterações sanguíneas.

Os ESP são efetuados pelo método manual. Para tal, coloca-se uma pequena gota de sangue numa das extremidades dum lâmina de vidro previamente limpa e desengordurada e com outra lâmina ou espalhador, fazendo um ângulo de aproximadamente 45°, deixa-se difundir a gota de sangue pela aresta e desliza-se longitudinalmente num movimento rápido e uniforme. Devemos obter uma camada fina de sangue, com três áreas distintas de grossura, que de seguida será fixada e corada pela coloração Wright (Figura 2).

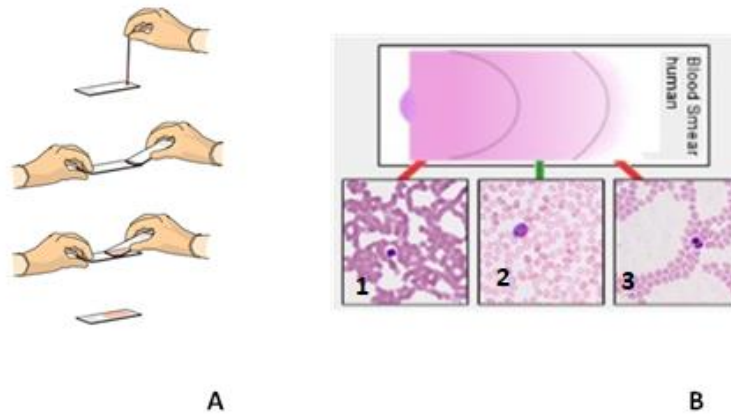


Figura 2: Esfregaço de sangue periférico. A: Método de distensão de sangue periférico; B: representação das 3 áreas da distensão (1: cabeça ou ponto de aplicação - área muito espessa e 3: franjas - área muito fina. Não adequadas para observação; 2: Corpo/monocamada do esfregaço - local ideal de observação).²

O corante de Wright é constituído por metanol, eosina e azul de metileno. O metanol serve essencialmente para fixar o esfregaço. A eosina e o azul de metileno são substâncias muito sensíveis às diferentes variações de pH das estruturas celulares. A eosina, sendo um corante ácido, tem maior afinidade por estruturas com propriedades basófilas, corando-as de laranja e cor-de-rosa. Da mesma forma, o azul de metileno que é um corante básico, cora estruturas com propriedades acidófilas, que adquirem uma coloração azulada [2]. Estruturas com propriedades neutras, fixam em simultâneo ambos os corantes. Após adição do corante e passados alguns minutos, é adicionado um tampão fosfato (PBS) com pH de 6,8 que ajuda a atenuar as variações de pH. No fim, é necessário lavar o esfregaço com abundante água destilada e deixar secar, de forma a poder ser observado ao microscópio ótico.

É importante ter alguns aspetos em consideração quando vamos observar um ESP. Primeiro devemos realizar uma avaliação macroscópica do esfregaço, tanto ao nível da qualidade, como da sua coloração, verificando se existem ou não precipitados. Seguidamente, proceder à avaliação microscópica, começando com a objetiva de menor ampliação (10x), que avalia a qualidade do esfregaço e deteta a presença de aglutinados de eritrócitos, eritrócitos empilhados (*roleaux*), agregados plaquetares e células anormais ou destruídas. Também devemos observar a distribuição e coloração dos leucócitos. Depois devemos observar com a objetiva de 40x e a seguir, com a objetiva de maior ampliação (100x), utilizando óleo de imersão. Na objetiva de maior ampliação fazemos a contagem diferencial dos leucócitos e observamos eventuais alterações morfológicas, identificando no mínimo 100 leucócitos

²

A: Fonte: BAIN, Barbara J. – Células sanguíneas: um guia prático. 5ª Edição, Artmed, 2016.

B: Adaptado: <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corepages/blood/blood.htm>

consecutivos. Nesta contagem também se incluem os leucócitos imaturos. Com a objetiva de 100x também observámos os eritrócitos e a sua morfologia, assim como, avaliámos as plaquetas.

É desejável que a informação fornecida ao clínico relativamente ao ESP seja concisa, informativa e relevante.

4.4. VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO

A velocidade de sedimentação eritrocitária corresponde à velocidade a que os eritrócitos existentes numa amostra de sangue total sedimentam no intervalo de uma hora. Esta amostra é colhida para um tubo estreito e graduado contendo citrato de sódio na proporção 1:4 e permite medir em milímetros a distância de sedimentação. O resultado é expresso em milímetros por hora (mm/h).

O mecanismo para ocorrer a sedimentação eritrocitária parece obedecer a um fenómeno físico, resultante das interações electroestáticas entre a membrana dos eritrócitos e diversas proteínas plasmáticas que favorecem ou diminuem a sua agregação [4].

Esta determinação não deve ser usada como teste de triagem, já que, é pouco específico e as suas alterações podem estar associadas a diversas patologias ou estados fisiológicos. Desta forma, apenas deverá funcionar como um teste complementar.

Normalmente os seus valores apresentam-se elevados em processos inflamatórios, anemia, gravidez, lesão tecidular, entre outros.

No LSJ esta determinação é realizada no equipamento LENA. Este equipamento utiliza o método de Westergren modificado, permitindo obter resultados em apenas 20 minutos. A leitura é feita por luz infravermelha a partir de um sensor incorporado no equipamento.

4.5. ELECTROFORESE DE HEMOGLOBINAS

As hemoglobinas normais presentes nos adultos, são a HbA, HbA₂ e a HbF que se apresentam em determinadas proporções, como já foi referido anteriormente. Para a realização da electroforese de hemoglobina, os eritrócitos são lavados e lisados, libertando a hemoglobina. Estas hemoglobinas tem uma determinada carga eléctrica e quando submetidas a um campo eléctrico em gel de agarose com pH alcalino (pH 8.5) migram para o ânodo. Quando há mudança na sequência dos aminoácidos das cadeias de globina formam-se variantes de hemoglobina, que migram de forma diferente. As várias frações da hemoglobina

podem ser visualizados mediante coloração com negro de amido e a sua quantificação relativa calculada por densitometria ótica.

As anomalias da hemoglobina podem ser estruturais ou qualitativas, dando origem as hemoglobinopatias, ou quantitativas, devido a um desequilíbrio na síntese de cadeias normais de globulinas, chamando-se talassémias.

No LSJ a eletroforese de hemoglobinas é feita no equipamento Sebia Hydrasis com o kit Hydragel Hemoglobin(E), que permite a separação das hemoglobinas normais A e A₂ e a deteção das principais hemoglobinas anómalas (S ou D e C ou E). Entre as hemoglobinopatias mais conhecidas temos a drepanocitose, onde a presença de HbS leva a que os eritrócitos adquiram a forma de foice (drepanócitos). As talassémias podem ser classificadas em alfa ou beta–talassémias, consoante o defeito da síntese se dê nas cadeias α ou β , respetivamente [5].

4.6. CASOS CLÍNICOS

A interligação dos resultados obtidos nas determinações das várias valências laboratoriais é fundamental para o diagnóstico clínico.

De seguida serão apresentados alguns casos clínicos que foram observados durante a minha passagem pelo laboratório. Os dados obtidos foram interpretados mediante as análises solicitadas pelo clínico, no entanto, durante a discussão dos mesmos, poderei sugerir alguns parâmetros que também podem ser determinados (e que na altura não foram solicitados pelo clínico), mas que auxiliam num possível diagnóstico diferencial.

4.6.1 CASO CLÍNICO I

Utente de 69 anos, sexo masculino, dirigiu-se ao laboratório fazendo as análises apresentadas na **Tabela 8**.

Tabela 8: Valores correspondentes ao caso clínico I.

		Parâmetro	Resultado	Unidades	Intervalo de referência
Hematologia	Série eritrocitária	Eritrócitos	4,86	$\times 10^6/\mu\text{L}$	3,900 – 5,000
		Hemoglobina	9,93 ↓	g/L	12,0 – 15,5
		Hematócrito	31,5 ↓	%	34,9 – 44,5
		VGM	64,9 ↓	fL	81,6 – 98,3
		HGM	20,4 ↓	pg	27,0 – 33,0

Parâmetro		Resultado	Unidades	Intervalo de referência
Série Leucocitária	CHGM	31,5 ↓	g/dL	32,0 – 36,0
	RDW	18,6 ↑	%	11,8 – 15,6
	Leucócitos	5,81	$\times 10^3/\mu\text{L}$	3,5 – 10,5
	Neutrófilos	2,53 (43,6)	$\times 10^3/\mu\text{L}$ (%)	1,7 – 7,0
	Eosinófilos	0,194 (3,34)	$\times 10^3/\mu\text{L}$ (%)	0,1 – 0,5
	Basófilos	0,101 (1,74)	$\times 10^3/\mu\text{L}$ (%)	< 0,3
	Monócitos	0,477 (8,21)	$\times 10^3/\mu\text{L}$ (%)	0,3 – 0,9
	Linfócitos	2,51 (43,1)	$\times 10^3/\mu\text{L}$ (%)	0,9 – 2,9
	Plaquetas	270	$\times 10^3/\mu\text{L}$	150 – 450
Bioquímica	Saturação da Transferrina	5 ↓	%	(20 – 50)
	Ferritina	7,0 ↓	ng/mL	(20,0 – 300,0)
	Ferro	22 ↓	$\mu\text{g/dL}$	(25 – 156)

Observando o eritrograma verificamos que este apresenta diminuição em quase todos os seus parâmetros, nomeadamente na hemoglobina, hematócrito e índices eritrocitários. Verifica-se também que o RDW está aumentado. Perante estes resultados podemos concluir que estamos perante uma anemia microcítica e hipocrómica, apresentando anisocitose, ou seja, desigualdade no tamanho dos eritrócitos.

Relacionando estes dados com os resultados bioquímicos do metabolismo do ferro, verificámos que todos os parâmetros estão diminuídos. Diminuição da saturação da transferrina, proteína que transporta o ferro no plasma, assim como, diminuição dos níveis séricos de ferritina, proteína que armazena o ferro, são o reflexo da deficiência de ferro, como se pode verificar também pelo seu doseamento.

Perante estes dados, podemos depreender que este utente apresenta uma anemia sideropénica. Este tipo de anemia é das mais frequentes em todas as faixas etárias, sendo várias as suas causas, como por exemplo: necessidades aumentadas por perdas hemorrágicas ou parasitoses, dieta pobre em ferro ou falência na absorção. Cabe ao clínico identificar a causa e instituir o tratamento adequado para reverter a situação.

4.6.2 CASO CLÍNICO II

Utente de 81 anos, sexo masculino, que se encontra num centro residencial para idosos foi solicitado hemograma completo, cujos resultados podem ser vistos na **Tabela 9**.

Tabela 9: Valores correspondentes ao caso clínico II.

		Parâmetro	Resultado	Unidades	Intervalo de referência
Hematologia	Série eritrocitária	Eritrócitos	3,50 ↓	$\times 10^6/\mu\text{L}$	3,900 – 5,000
		Hemoglobina	11,4 ↓	g/L	12,0 – 15,5
		Hematócrito	35,2	%	34,9 – 44,5
		VGM	101,0 ↑	fL	81,6 – 98,3
		HGM	32,7	pg	27,0 – 33,0
		CHGM	32,5	g/dL	32,0 – 36,0
		RDW	18,6 ↑	%	11,8 – 15,6
	Série Leucocitária	Leucócitos	3,00 ↓	$\times 10^3/\mu\text{L}$	3,5 – 10,5
		Neutrófilos	1,82 (60,6)	$\times 10^3/\mu\text{L}$ (%)	1,7 – 7,0
		Eosinófilos	0,014 (0,466)	$\times 10^3/\mu\text{L}$ (%)	0,1 – 0,5
		Basófilos	0,025 (0,835)	$\times 10^3/\mu\text{L}$ (%)	< 0,3
		Monócitos	0,374 (12,5)	$\times 10^3/\mu\text{L}$ (%)	0,3 – 0,9
		Linfócitos	0,771 (25,7)	$\times 10^3/\mu\text{L}$ (%)	0,9 – 2,9
	Plaquetas	102 ↓	$\times 10^3/\mu\text{L}$	150 – 450	
	PDW	8,1	fL	5,9 – 9,8	

Pelos resultados do hemograma verifica-se que existe pancitopenia, já que, eritrócitos, plaquetas e leucócitos estão diminuídos. Verifica-se também um valor diminuído para a hemoglobina e um VGM elevado, estando perante uma anemia macrocítica.

A este doente também lhe foram solicitadas as transaminases alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, lactato-desidrogenase e doseamento de bilirrubinas total e direta. Todos estes parâmetros apresentavam-se dentro da normalidade.

Perante estes dados, deveria fazer-se uma avaliação do esfregaço de sangue periférico, observando-se a morfologia de todas séries celulares, assim como, realizar-se o doseamento

de vitamina B₁₂ e folato e contagem de reticulócitos. Os resultados destes doseamentos podem ser indicativos da etiologia da anemia.

No esfregaço de sangue periférico é importante ter em consideração a forma dos macrócitos (ovais ou arredondados), presença de anisocitose e poiquilocitose, segmentação do núcleo dos neutrófilos, assim como, leucócitos e plaquetas displásicas. Estes dados são muito importantes na orientação diagnóstica.

Se estivermos perante uma anemia megaloblástica, poderemos ter deficiência de folato ou deficiência de vitamina B₁₂, essenciais na hematopoiese, sobretudo na síntese de ADN. A etiologia destes défices deve ser determinada, por isso, quando há deficiência de vitamina B₁₂, deve-se determinar a presença de anticorpos anti-fator intrínseco (glicoproteína produzida pelas células parietais, e que se combina com a vitamina B₁₂ para esta ser absorvida no intestino) e/ou presença de anticorpos anti-células parietais (APCA), de forma a excluir a anemia perniciosa, anemia de origem autoimune. A anemia megaloblástica também cursa com pancitopenia e apresenta neutrófilos hipersegmentados.

Excluindo a anemia megaloblástica, as macrocitoses também podem ocorrer nas síndromes mielodisplásicas, doenças hepáticas (hipótese que pode ser excluída para o nosso utente, já que, os marcadores hepáticos estavam dentro da normalidade), hemorragia recente ou hemólise (sugere-se a contagem de reticulócitos) ou por efeito medicamentoso (imunossuppressores, por exemplo). Caberá ao clínico solicitar as determinações que considere pertinentes, consoante o historial clínico do utente para determinar a possível causa desta macrocitose e estabelecer o tratamento adequado.

4.7. HEMOSTASE

A hemostase é a capacidade que o organismo tem de fazer frente de forma rápida e eficaz à perda de sangue nos locais de lesão vascular, pela formação local de um trombo de fibrina, e simultaneamente permitir a manutenção do fluxo sanguíneo. Este trombo de fibrina é mantido até a completa cicatrização do vaso, altura em que é degradado completamente, de forma a atingir de novo o estado de normalidade.

Este é um processo altamente complexo e regulado que envolve vários intervenientes. Eles são a parede do vaso, nomeadamente as células endoteliais, as plaquetas e proteínas plasmáticas (fatores da coagulação, inibidores da coagulação e proteínas do sistema fibrinolítico).

A hemostase inclui a constrição do vaso lesado, a ativação, adesão e agregação plaquetar, a ativação das várias vias do sistema de coagulação (Figura 3), assim como, a ativação do sistema fibrinolítico.

Quando há lesão do vaso sanguíneo, as células do endotélio exibem colagénio, que em circunstâncias normais não está em contacto com o sangue. As plaquetas que circulam no local da lesão, ao entrar em contacto com o colagénio vão ser ativadas e começam a aderir e agregar-se na superfície lesada, formando um trombo plaquetar (hemostase primária). Em simultâneo, o fator tecidual também vai ser exposto, ativando a cascata de coagulação, onde intervêm um conjunto de proteínas plasmáticas (fatores da coagulação) que a partir de reações enzimáticas progressivas e amplificadas geram um coágulo de fibrina estável (hemostase secundária). Finalmente, é necessário que exista um mecanismo que permita a degradação controlada do coágulo, que é conseguido a partir de proteínas plasmáticas que atuam quando a lesão do vaso está resolvida (fibrinólise)[19].

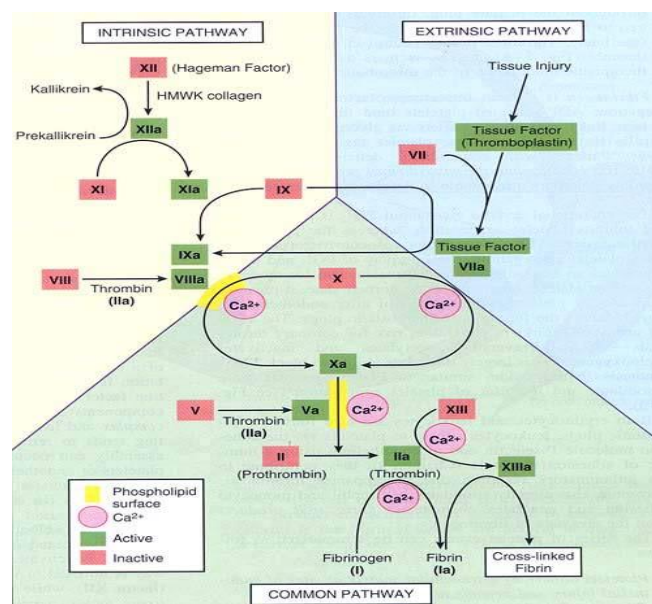


Figura 3: Cascata da Coagulação³.

É essencial o equilíbrio na formação do coágulo e na sua posterior degradação, já que, qualquer alteração num ou mais intervenientes da hemostase podem resultar num distúrbio hemorrágico ou na tendência para coagular.

Nas provas de hemostase é utilizado plasma obtido a partir de sangue venoso colhido para um tubo com citrato de sódio. O citrato de sódio é um anticoagulante que vai neutralizar os íons de cálcio, inibindo assim a cascata da coagulação. A proporção de anticoagulante e amostra é fundamental para garantir que não há alteração do fator de diluição e que os

³ Adaptado: http://vet.uga.edu/ivcvm/courses/VPAT5200/01_circulation/hemostasis/images/clotcascade.jpg

nossos resultados são fiáveis, evitando assim diagnósticos incorretos que levem a tratamentos inadequados. A relação correta do volume de citrato e sangue deverá ser 1:9. A amostra deverá ser centrifugada de forma a obter um plasma pobre em plaquetas.

No LSJ todas as provas da hemostase são realizadas no equipamento Sysmex CA-1500, com exceção da quantificação dos D-dímeros (feita no ARCHITECT no módulo c8000).

O Sysmex CA-1500 deteta o coágulo de fibrina por turbidimetria. Para um determinado volume de amostra é adicionado um volume predefinido de reagente, conforme o teste que está a ser avaliado. Esta mistura vai ser exposta a um feixe de luz com um comprimento de onda de 660 nm e a turbidez da mesma, pelo processo de conversão de fibrinogénio em fibrina, vai ser detetada pela mudança de intensidade de luz que é transmitida. Um fotodíodo recebe a luz transmitida e converte a intensidade da luz em sinais elétricos, sinais estes que são analisados pelo equipamento e convertidos em tempo de coagulação [6].

É de ressaltar que como em qualquer determinação analítica, mais importante que obter um resultado, é sabê-lo interpretar.

4.7.1 TEMPO DE PROTROMBINA

O tempo de protrombina é uma prova de *screening* que visa avaliar globalmente a via extrínseca (Fator VII), assim como, a via final comum da coagulação (Fatores II, V, X e fibrinogénio).

Para tal, vai ser medido o tempo que a amostra demora a formar coágulo após adição sequencial de uma concentração ótima de tromboplastina tecidual (de origem animal: humano, coelho ou recombinante) que equivale ao fator tecidual *in vivo*, e ainda adição de cálcio e fosfolípidos (que substituem a membrana das plaquetas ativadas) [10].

Este tipo de prova avalia deficiências congénitas ou adquiridas de fatores da via extrínseca e da via comum, como foi referido anteriormente, controla a capacidade de síntese do fígado, deteta deficiência de vitamina K, assim como, monitoriza a terapêutica com anticoagulantes orais [19].

Os resultados de TP geralmente são relatados sob a forma de tempo (segundos), mas também pela razão do TP e pelo cálculo do *International Normalized Ratio* (INR).

A razão do TP é o quociente entre o tempo de coagulação da amostra e o tempo de coagulação dado por uma pool de plasma com valores de normalidade de TP ou um

controlo normal. Esta razão é dada em percentagem e em indivíduos saudáveis é aproximadamente 100%.

O cálculo do INR é de extrema importância no controlo da terapêutica com anticoagulantes orais. Como já foi referido, as tromboplastinas podem ter origens diferentes e em consequência podemos ter ligeiras variações nos tempos para a mesma amostra de plasma [7]. Posto isto, é imprescindível que exista uma uniformização relativamente ao TP para deste modo ser possível comparar os resultados obtidos em qualquer laboratório. A fim de compensar estas diferenças, é necessário que se saiba a sensibilidade da tromboplastina utilizada expressa pelo *Internacional Sensitivity Index* (ISI). O ISI, não é mais que um fator de correção utilizado pelos fornecedores dos reagentes, e que geralmente varia a cada lote. Este ISI é determinado comparando cada reagente com a tromboplastina padrão (OMS). O INR vai resultar da razão do TP elevado ao ISI.

É fundamental que a cada lote diferente de tromboplastina tecidual, assim como o TP da *pool* normalizada, sejam atualizados para que os cálculos nas amostras sejam o mais corretos possíveis.

4.7.2 TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA

O aPTT é um teste de *screening* usado no estudo global da via intrínseca (Fatores XII, XI, IX e VIII), assim como da via comum da coagulação (Fatores X, V, II e fibrinogénio). Mede o tempo de coagulação do plasma, após a adição de um ativador dos fatores da fase de contacto (sem adição de fator tecidual), cálcio e fosfolípidos.

Este parâmetro avalia défices congénitos ou adquiridos dos fatores da via intrínseca e da via comum, alteração da capacidade de síntese hepática, deficiência da vitamina K, monitorização da terapêutica com heparina não fracionada e presença de anticoagulante lúpico e outros inibidores (anti-fator, por exemplo) [10] [19].

O resultado deverá ser expresso em segundos.

4.7.3 TEMPO DE TROMBINA

É o parâmetro que permite avaliar a última fase da coagulação (via comum), em que o fibrinogénio é convertido em monómeros de fibrina. Para tal, é adicionada trombina na amostra de plasma citratado. Desta forma, faz-se uma avaliação qualitativa do fibrinogénio, em que o tempo que a amostra demora a coagular é inversamente proporcional à quantidade de fibrinogénio presente. O resultado vem expresso em segundos [10].

Este parâmetro tem utilidade clínica para confirmar ou descartar a presença de heparina no plasma, presença de anti-IIa e anormalidades qualitativas/quantitativas do fibrinogénio.

Este parâmetro raramente é solicitado, sendo mais comum o doseamento de fibrinogénio, como veremos a continuação.

4.7.4 DOSEAMENTO DE FIBRINOGENIO (MÉTODO DE CLAUSS)

O fibrinogénio é o último interveniente da via comum da coagulação. Este doseamento visa uma determinação quantitativa do fibrinogénio pela adição de trombina em altas concentrações na amostra de plasma diluída, sendo a formação de fibrina apenas dependente da quantidade de fibrinogénio existente [12].

Mede-se o tempo que a amostra demora a formar coagulo de fibrina, sendo o valor de fibrinogénio extrapolado a partir duma curva de calibração, resultante das diluições seriadas realizadas num plasma de referência, com concentrações de fibrinogénio conhecidas.

O doseamento de fibrinogénio permite-nos controlar carências congénitas, hepatopatias, monitorização da terapia fibrinolítica e CID (coagulação intravascular disseminada)[19].

4.7.5 PESQUISA DE ANTICOAGULANTE LÚPICO

O anticoagulante lúpico é um autoanticorpo dirigido contra proteínas que ligam fosfolípidos. Estes anticorpos prolongam os testes de coagulação *in vitro* e estão associados a um risco trombótico significativo.

No LSJ esta determinação é realizada a partir de um teste de mistura, onde vamos repetir o aPTT e a interpretação do resultado é dado pela razão do aPTT. A amostra de plasma do paciente, cujos tempos estão prolongados, é misturada com uma amostra de plasma de um paciente com tempos normais (ou seja, com presença de todos os fatores). Se a razão do aPTT da mistura corrige e normaliza, relativamente à razão da amostra inicial, não estaremos na presença de AL, mas talvez na presença de alguma deficiência de fator. Se a razão do aPTT da mistura não corrige, então estaremos na presença de inibidores (entre os quais se pode incluir o AL) que prolongam o tempo da amostra “controlo” que inicialmente era normal [10].

4.7.6 DOSEAMENTO DE D-DÍMEROS

Ao contrário dos últimos parâmetros referentes à hemostase que no LSJ são realizados no equipamento Sysmex CA-1500, o doseamento dos D-dímeros é realizado no autoanalisador ARCHITECT no módulo c8000 utilizando o plasma citratado.

Os D-dímeros são domínios antigénicos que resultam da degradação da fibrina insolúvel pela plasmina durante a fibrinólise. Níveis de D-dímero elevados no plasma são indicadores que a fibrina está a ser degradada, o que significa que a fibrina foi formada previamente [10].

O seu aumento no plasma pode estar relacionado com CID, processos inflamatórios ou infecciosos, gravidez, enfarte do miocárdio, idade, entre outros. Esta determinação também é de grande utilidade clínica no diagnóstico de trombose venosa profunda e embolismo pulmonar.

A sua quantificação é feita por imunoturbidimetria. Para tal, utiliza-se partículas de latex revestidas com um anticorpo monoclonal específico anti-D-dímero. Ao adicionar a amostra, há formação de um complexo antigénio-anticorpo na presença de D-dímeros. Estes complexos alteram a turbidez da suspensão e a sua concentração é tanto maior quanto menor for a transmitância, que é medida por espectrofotometria. O resultado é expresso em microgramas por litro ($\mu\text{g/L}$).

4.7.7 CASOS CLÍNICOS

4.7.7.1 CASO CLÍNICO III

Utente de 84 anos, sexo masculino a quem foi solicitado hemograma e tempo de protrombina para monitorização da terapêutica com anticoagulantes orais, apresenta os seguintes resultados que constam na Tabela 10, assim como, os resultados de uma vinda anterior ao laboratório.

Tabela 10: Valores correspondentes ao caso clínico III.

Parâmetro	Resultado 04/2017	Resultado 03/2017	Unidades	Valores de referência
Tempo de protrombina	43,3	20,6	segundos	10,1 – 14,8
Razão de TP	17,4	41,6	%	70,0 – 130,0
INR	4,0	1,81		0,86 – 1,27
Plaquetas	107	102	$\times 10^3/\mu\text{L}$	150 – 450

A terapêutica com anticoagulantes orais, ou antagonistas da vitamina K, é usada na prevenção do aparecimento de trombos inesperados. Existem múltiplos fatores que podem interferir com estes anticoagulantes, por isso, as doses devem ser ajustadas individualmente, exigindo um estreito controlo e vigilância clínica periódica, de modo a evitar complicações trombóticas ou hemorrágicas.

Este utente apresenta-se com trombocitopenia, situação que já se verificava na sua vinda anterior. Será de esperar que este utente apresente o TP prolongado, visto que usa anticoagulantes orais, deste modo, a avaliação será feita pelo INR. O INR quando o utente fez as determinações a 03/2017 apresentava-se ligeiramente aumentado, tendo em consideração os valores de referência que são utilizados na rotina para indivíduos saudáveis. Sendo um utente que utiliza anticoagulantes orais, não podemos utilizar os valores de referência para indivíduos saudáveis. Cabe ao clínico avaliar e ter em consideração a patologia de base e os respetivos valores terapêuticos para o INR (sendo a maioria dos casos entre 2,0-3,0, salvo raras exceções em que pode ser superior). Na sua vinda a 04/2017 o valor de INR já estava consideravelmente aumentado, por isso, é bastante provável que o clínico proceda ao ajuste da dose de anticoagulante e faça novo controlo.

4.7.7.2 CASO CLÍNICO IV

Utente de 75 anos, sexo feminino e que estava no internamento, foram-lhe pedidas as determinações do tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada. Esta utente não tinha histórico no laboratório. Os valores obtidos constam na **Tabela II**.

Tabela II: Valores correspondentes ao caso clínico IV.

Parâmetro	Resultado	Unidades	Valores de referência
Tempo de protrombina	48,7 ↑	segundos	10,1 – 14,8
Razão de TP	15,6	%	70,0 – 130,0
INR	4,47		0,86 – 1,27
aPTT	45,5 ↑	segundos	23,0 – 31,9

Como se pode verificar, ambos os tempos estão prolongados. Não havendo qualquer informação relativamente à utente, várias hipóteses podem ser colocadas para esclarecer o prolongamento dos tempos, como por exemplo, se sofre de alguma patologia hepática que possa estar na origem do défice de fatores da via comum, se lhe são administrados

anticoagulantes orais diretos ou heparina não fracionada, se tem carência de vitamina K, se existe a presença de algum inibidor, ou se estamos perante uma coagulação intravascular disseminada.

Quando temos estes dois tempos prolongados pode ser pedido o tempo de trombina e doseamento de fibrinogénio. Se estes doseamentos derem valores normais, estamos perante deficiência de fatores da via comum. Se por acaso, o tempo de trombina der prolongado, então poderemos estar perante uma deficiência de fibrinogénio (que será confirmada com o seu doseamento) ou então estar na presença de heparina no plasma (o teste de reptilase poderá confirmar o descartar a presença de heparina, normalizando o tempo, já que, não é afetado pela heparina). Os anticoagulantes orais diretos, ao atuar diretamente sobre os fatores da via comum, afetam o TP, aPTT e TT, prolongando-os.

Os testes de mistura (com determinação do TP e aPTT) também podem ser requeridos. Caso os tempos normalizem, poderemos estar perante uma deficiência de fator que é corrigida pela adição de um plasma com tempos normais (ou seja, sem deficiência de fatores), caso os tempos permaneçam prolongados, poderemos estar perante um inibidor.

A coagulação intravascular disseminada vai levar ao consumo de fatores da coagulação e plaquetas, o que conseqüentemente irá prolongar os tempos. Esta síndrome pode ser confirmada pelo doseamento dos D-dímeros, que estarão elevados.

4.8. IMUNO-HEMATOLOGIA

A membrana eritrocitária é composta por diversos carboidratos e proteínas, que funcionam como antigénios e são capazes de induzir a formação de anticorpos. Consoante a presença destes antigénios podemos fazer a tipagem do sangue em vários sistemas de grupos sanguíneos. O sistema AB0 e o sistema Rh são os mais conhecidos.

4.8.1 SISTEMA AB0 E RH

O sistema AB0 é composto pelos antigénios A, B e H e pelos anticorpos naturais anti-A e anti-B. Estes anticorpos estão presentes consoante o antigénio não expresso na membrana eritrocitária, isto é, indivíduos com antigénios A desenvolvem anticorpos anti-B, indivíduos com antigénios B apenas desenvolvem anticorpos anti-A. Todos os indivíduos têm antigénios H (salvo raras exceções) [1][19]. Os indivíduos que apenas tem antigénio H, desenvolve anticorpos anti-A e anti-B. Estes anticorpos são essencialmente do tipo IgM e são capazes de aglutinar e lisar os eritrócitos, por isso, e visto que eles são formados naturalmente, após

uma única transfusão de eritrócitos AB0 incompatíveis pode ocorrer hemólise intravascular grave que pode levar à morte. Na **Tabela 12** estão apresentadas a classificação sanguínea segundo o sistema AB0 tendo em conta os antígenios e anticorpos presentes.

Tabela 12: Classificação sanguínea segundo do Sistema AB0.

Grupo	Antígenios	Anticorpos
0	H (ausência de A e B)	Anti-A e Anti-B
A	A	Anti-B
B	B	Anti-A
AB	A e B	-

O sistema Rh é bastante complexo, constituído por muitos antígenios diferentes, codificados por vários genes. Os antígenios deste sistema são: D, C/c e E/e. Estes antígenios induzem a produção de anticorpos essencialmente do tipo IgG, após a exposição com eritrócitos incompatíveis, sendo o antígeno D considerado o mais imunogénico. Se os eritrócitos de um indivíduo possuírem o antígeno D este é considerado Rh-positivo, caso haja ausência do antígeno D é considerado Rh-negativo, independentemente da presença dos outros antígenios [19].

A seu interesse clínico deve-se essencialmente pelo seu envolvimento na doença hemolítica do recém-nascido (já que, os anticorpos do tipo IgG conseguem atravessar a barreira placentária) e nas reações transfusionais hemolíticas.

No LSJ a tipagem sanguínea AB0/Rh é feita a partir de técnicas de aglutinação. Para tal, utilizam-se soros contendo anticorpos específicos para os antígenios A, B e D. Uma gota de anti-A, anti-B e anti-D são colocadas respetivamente numa lâmina, a cada gota é adicionada uma gota de sangue total colhido com EDTA que vai conter os respetivos antígenios eritrocitários. Se os eritrócitos do paciente tiverem antígenios para os respetivos anticorpos, então formam-se imunocomplexos com as partículas antigénicas. Estes imunocóplexos ligam-se entre si e formam aglutinados que são visíveis à vista desarmada (**Tabela 13**).

Tabela 13: Tipagem de sanguínea segundo a classificação AB0/Rh.

Aglutina			Tipagem AB0/Rh
Anti-A	Anti-B	Anti-D	
x	-	x	A Rh positivo
-	x	x	B Rh positivo
x	x	x	AB Rh positivo
-	-	x	O Rh positivo
x	-	-	A Rh negativo
-	x	-	B Rh negativo
x	x	-	AB Rh negativo
-	-	-	O Rh negativo

4.8.2 TESTE DE COOMBS

O teste de Coombs pode ser direto ou indireto. O Coombs direto visa pesquisar a sensibilização eritrocitária, isto é, detetar anticorpos ligados aos eritrócitos *in vivo*. Para tal, é adicionada uma gota de soro de Coombs (que é um soro que contém anticorpos anti-imunoglobulina humana) a uma gota de sangue total (colhido com EDTA) do paciente, verificando-se se existe aglutinação. Caso haja aglutinação pelo teste de Coombs direto, podemos estar perante várias condições: reação hemolítica transfusional, doença autoimune, doença hemolítica do recém-nascido, ou secundária ao uso de medicamentos. No teste de Coombs indireto vamos pesquisar a presença de anticorpos, a partir de uma reação entre anticorpos do paciente e uma suspensão numa *pool* de eritrócitos do tipo O (Rh positivos e negativos), *in vitro*. Se após uma fase adequada de incubação for adicionado soro de Coombs e houver aglutinação, dizemos que estamos perante anticorpos anti-eritrocitários. Este teste é muito utilizado para acompanhar doentes que foram sensibilizados por antígenos de qualquer sistema sanguíneo, mas principalmente do sistema Rh. Nas grávidas Rh negativas, este teste é muito solicitado, para verificar se estas apresentam anticorpos anti-D, com o intuito de avaliar se existe o risco de desencadear a doença hemolítica do recém-nascido [10].

5. SECTOR MICROBIOLOGIA

O sector da Microbiologia contribui para o diagnóstico e auxílio no tratamento de doenças infecciosas.

No LSJ são solicitadas para uma grande diversidade de amostras biológicas, a pesquisa e identificação de bactérias, fungos e parasitas. Igualmente, são realizadas análises que visam detetar a resposta dada pelo sistema imunológico perante a infeção causada por agentes etiológicos de infeção, como por exemplo os vírus, para além dos outros agentes enunciados anteriormente. São também realizados testes de suscetibilidade aos antimicrobianos para orientação do tratamento.

Esta é uma das áreas do laboratório menos automatizada, embora para algumas das determinações também se recorra à utilização de equipamentos automatizados.

É de extrema importância que sejam seguidas as normas relativas à colheita, transporte, conservação, processamento e armazenamento das amostras biológicas.

A colheita da amostra deverá ser feita preferencialmente numa fase inicial da infeção e mesmo antes de qualquer terapêutica antibiótica, já que, estes interferem com resultado.

É fundamental conhecer o tipo de flora normal e possíveis contaminantes que possam surgir, consoante o local anatómico de onde provem o produto que estamos a trabalhar. Desta forma será dado o tratamento mais adequado à amostra, sendo possível identificar o microrganismo que está implicado no quadro clínico do paciente, assim como, poder recomendar um tratamento adequado.

5.1. HEMOCULTURA (SANGUE)

Em condições normais o sangue é um fluido estéril, logo, o seu exame bacteriológico visa pesquisar a presença de microrganismos na corrente sanguínea.

É muito importante que o local onde é realizada a venopunção seja corretamente desinfetado e que o volume de sangue colhido corresponda à proporção recomendada pelo fabricante do meio de cultura utilizado [10].

Quanto maior o volume de sangue que for possível colher, maiores serão as probabilidades de encontrar o microrganismo que está a provocar a infeção, já que, na maior parte das situações estes microrganismos não se encontram em grande número.

A presença de qualquer microrganismo deverá ser valorizada, embora seja necessário estar alerta para a presença de contaminantes da pele que podem confundir a interpretação dos

resultados e gerar falsos positivos [13]. Nestes casos, será necessário ter um espírito crítico e valorizar de acordo com o contexto clínico do paciente.

É obrigatório nunca refrigerar as hemoculturas após a colheita para garantir a viabilidade de eventuais microrganismos. Elas deverão ser incubadas a 37°C durante 7 dias e só ao fim deste tempo poderá ser considerado o resultado negativo. Existem microrganismos cujo crescimento é mais lento, e nestes casos o tempo de incubação deverá ser mais prolongado.

O sistema para hemocultura usado no LSJ é o Oxoid SIGNAL® Blood Culture System (Figura 4). Este sistema consiste numa garrafa contendo um meio líquido de enriquecimento constituído essencialmente por tripticase de soja e polianetolsulfonato de sódio (SPS), entre outros constituintes. Este meio permite o crescimento de microrganismos aeróbios, anaeróbios e microaerofílicos [11][23]. O SPS tem a particularidade de ajudar a inativar a ação dos antibióticos na amostra de sangue, neutralizar a ação bactericida do soro, prevenir a fagocitose, inibir a coagulação e servir de suporte nutricional.

Este sistema tem uma câmara acoplada com uma agulha que vai até ao fundo do meio líquido e que funciona como indicador de crescimento. Sempre que se gera pressão positiva na garrafa, há deslocamento da mistura para a câmara que funciona como um *signal* da proliferação bacteriana, derivado da geração de gases, consequência da sua atividade metabólica. É importante também a inspeção visual da cultura, para verificar turbidez, hemólise ou formação de película ou colónias visíveis entre o meio de cultura e o sedimento eritrocitário [11].

Desta forma quando é requerida uma hemocultura, a fase inicial irá consistir num exame macroscópico, através da visualização diária e de forma a verificar a existência de crescimento bacteriano. Caso se verifique crescimento, a hemocultura é considerada positiva e deverá ser preparado um esfregaço em lâmina a partir desta. O esfregaço deverá ter um gradiente de espessura suficientemente denso que facilite a visualização, ser fixado pelo calor e corado pela técnica de coloração de Gram (Anexo A), assim como, realizar a subcultura em meio sólido.



Figura 4: Sistema de hemocultura OXOID SIGNAL^{®4}.

A coloração de Gram é uma coloração diferencial, já que, permite distinguir as bactérias consoante a estrutura da sua parede celular, podendo-as classificar em Gram positivas e Gram negativas. As bactérias Gram positivas são formadas por uma camada espessa de peptidoglicano ficando coradas de púrpura e as Gram negativas são compostas por uma camada fina de peptidoglicano, assumindo uma coloração rosa. O corante violeta de Genciana penetra no interior da bactéria e forma um complexo com o soluto de Lugol (constituído por iodo), quando este é adicionado. Ao ser aplicado o diferenciador, este complexo não é removido das bactérias Gram positivas devido à espessura do peptidoglicano das suas paredes, o que confere a tonalidade púrpura. Por outro lado, as bactérias Gram negativas ao ter uma espessura de peptidoglicano muito menor, a aplicação do diferenciador remove os complexos formados entre o violeta de Genciana e o soluto de Lugol, tornando a membrana muito permeável e descorando-as. Para visualizar as bactérias Gram negativas é então adicionado um segundo corante de contraste, a Fucsina de Ziehl diluída, conferindo a estas bactérias uma coloração rosa [10].

Ao observar o esfregaço corado, devemos fazê-lo com a objetiva de 100x (objetiva de imersão). Para além da cor adquirida pelas bactérias, também devemos observar a sua morfologia e classificá-las em cocos ou bacilos. Os cocos podem estar agrupados e serem classificados consoante o seu arranjo. Se este arranjo for em cacho denominam-se estafilococos, se for em cadeia são estreptococos. Caso se verifique a presença de fungos, deveremos classificá-los como fungos leveduriformes ou filamentosos.

Os meios sólidos utilizados para a subcultura são o meio Columbia Agar+Sheep Blood Plus – (COLS+), também conhecido por gelose de sangue, e o meio Chocolate Agar+Vitox – (CHOCV) (Figura 5).

⁴ Fonte: <https://www.fishersci.com/shop/products/thermo-scientific-oxid-signal-blood-culture-system-blood-culture-system/r65410>

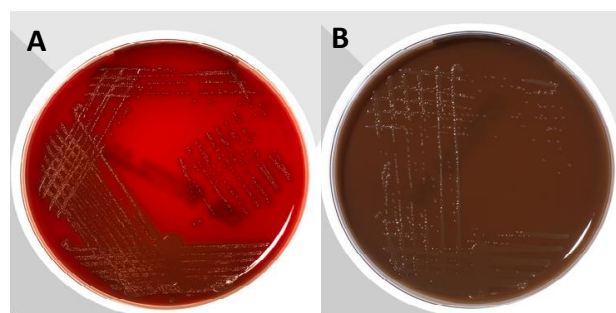


Figura 5: Meios sólidos utilizados para subcultura de hemocultura – A: Meio Columbia Agar+Sheep Blood Plus; B: Meio Chocolate Agar+Vitox⁵

O meio COLS+ é um meio enriquecido que deriva da combinação de peptonas que fornecem azoto, carbono, vitaminas e alguns elementos vestigiais. Possui extrato de levedura como fonte de vitaminas do complexo B e sangue de carneiro que permite a detecção de reações hemolíticas, já que, fornecem fator X (hemina), necessário para o crescimento de muitas espécies patogênicas. O sangue de carneiro contém NADase que destrói o dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD), também denominado por fator V.

Há microrganismos que para crescerem necessitam fatores X e V. Por esta razão devemos utilizar também o meio CHOCV. Este é um meio enriquecido, obtido por aquecimento do sangue que liberta o fator X e é suplementado com fator V. Deste modo é possível recuperar microrganismos mais fastidiosos como as *Neisseria spp.* e *Haemophilus spp.* [11].

Após sementeira, pela técnica de esgotamento do produto por extensão à superfície do meio sólido (Figura 6), as subculturas devem ser incubadas numa atmosfera com 5% de CO₂ a 37°C até 48h para depois prosseguir com a sua identificação e efetuar o teste de suscetibilidade a antimicrobianos (TSA) de acordo com o protocolo do laboratório.

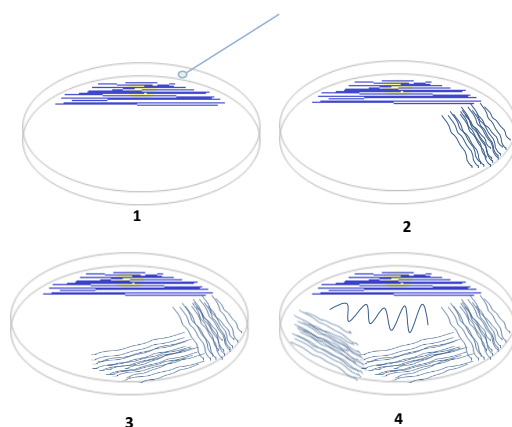


Figura 6: Esquema representativo da técnica de esgotamento por extensão à superfície do meio sólido. 1: Esgotamento inicial; 2,3 e 4: Sequência de estrias.

⁵

A: Adaptado de: <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/30-columbia-agar-+-5-percent-sheep-blood>

B: Adaptado de: <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/27-chocolate-agar-polyvitex>

Existem outros fluidos biológicos que habitualmente são estéreis e que podem ser inoculadas nos frascos de hemocultura, nomeadamente o líquido pleural, líquido cefalorraquidiano (LCR), entre outros.

5.2. FEZES

A infeção do trato gastrointestinal pode ser devida a vários agentes enteropatogénicos que alteram a função intestinal.

O despiste de rotina é direcionado para os principais agentes bacterianos, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Campylobacter spp.* e *Staphylococcus aureus* [10][13].

Outras pesquisas como *Yersinia*, pesquisa de Rotavírus/Adenovírus, pesquisa das toxinas A e B do *C. difficile* e *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7 devem ser solicitados à parte, já que, tem procedimentos especiais.

O tempo que medeia entre a colheita e o seu processamento deve ser inferior a 2h e a amostra deverá ser mantida a uma temperatura inferior a 20°C caso não seja possível refrigerar.

Os meios utilizados na rotina do LSJ para coproculturas são meio Hektoen Enteric – (HE), meio de Chapman – (CHAP) e meio *Campylobacter* Karmali Selective – (CCDA) (Figura 7).

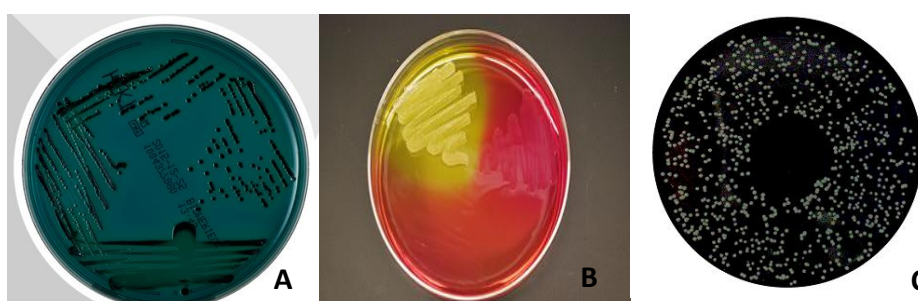


Figura 7: Meios utilizados para coprocultura – A: Meio Hektoen Enteric; B: Meio de Chapman; C: Meio *Campylobacter* Karmali Selective⁶.

O meio HE é simultaneamente seletivo e diferencial para microrganismos entéricos Gram negativos. É utilizado para isolar espécies de *Shigella* e *Salmonella*. Na sua composição contém sais biliares que tornam o meio seletivo porque inibe o crescimento de bactérias Gram positivas e algumas bactérias não patogénicas Gram negativas. Foram incluídas lactose, sacarose e salicina que permitem a diferenciação entre espécies de *Salmonella* e *Shigella* não

⁶

A: Adaptado: <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/38-hektoen-agar>

B: Adaptado: <https://www.flickr.com/photos/medmicro/3396459999/in/album-72157616105563630/>

C: Adaptado: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/PO5041A?ICID=search-product>

fermentadoras destes compostos, de microrganismos entéricos que ao fermentar estes compostos produzem ácidos que provocam uma alteração da cor do indicador de pH. As espécies não fermentadoras formam colónias azuis/verdes e as fermentadoras formam colónias amarelas/alaranjadas. O citrato de amónio férrico e tiosulfato de sódio presentes no meio permitem a deteção de sulfureto de hidrogénio (H₂S). As salmonelas produzem H₂S formando colónias com um precipitado preto. O sistema indicador de pH é fucsina ácida e azul de bromotimol [11].

O meio CHAP é um meio seletivo e diferencial para *Staphylococcus spp.*, agente que por vezes está na origem das diarreias. Tem na sua constituição peptonas, manitol e vermelho de fenol como indicador de pH. Apresenta também uma concentração de 6,5% de cloreto de sódio que permite uma inibição parcial ou completa de microrganismos que não sejam halotolerantes. A fermentação com manitol permite a diferenciação das espécies de estafilococos, já que, as espécies que fermentam o manitol produzem colónias amarelas, sendo indicativo de *S. aureus*. As espécies não fermentadoras de manitol produzem colónias vermelhas e nenhuma alteração do indicador de pH [11].

O meio CCDA é um meio seletivo para *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*. Tem como base o meio Columbia, carvão ativado, agentes redutores, antibióticos e antifúngicos [11].

Os meios HE e CHAP devem ser incubados entre 18-24h a 37°C em atmosfera de aerobiose. O meio CCDA deverá ser incubado numa atmosfera microaerofílica e capnofílica a 42°C, durante 48-72h. Após incubação deveremos prosseguir com a identificação e efetuar o TSA de acordo com o protocolo do laboratório.

Para pesquisa de *Yersinia spp.* é utilizado o meio *Yersinia Selective* (Figura 8). Este meio contém peptonas e manitol [11]. A *Yersinia enterocolitica* fermenta o manitol e na presença de vermelho neutro e origina colónias características de "olho-de-boi", incolores/rosa pálido e com centros vermelhos. A inibição seletiva de organismos Gram negativos e Gram positivos obtém-se por meio do cristal violeta, desoxicolato de sódio e os agentes antimicrobianos. Este meio deverá ser incubado em aerobiose durante 18-24h a 32°C. As colónias isoladas deverão ser identificadas e realizado o respetivo TSA.



Figura 8: Meio *Yersinia* Selective com crescimento de colónias de *Yersinia enterocolitica*⁷.

A pesquisa de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7 utiliza para o seu isolamento o meio seletivo MacConkey/Sorbitol. Este meio contém lactose e peptonas que servem de fonte de nitrogénio. O sorbitol é um hidrato de carbono fermentável que a maioria das estirpes de *E. coli* hemorrágicas não fermentam, dando origem a colónias incolores. Os sais biliares e o cristal violeta são agentes seletivos que inibem o desenvolvimento de organismos Gram-positivos e o vermelho neutro é um indicador de pH [11]. A incubação deverá ser feita em aerobiose durante 18-24h a 37°C e as colónias isoladas deverão ser identificadas e realizado o respetivo TSA.

Pesquisa de toxinas A e B do *Clostridium difficile* é apenas realizada quando solicitada pelo clínico e deverá ser feita em amostras diarreicas, já que, este é um dos sinais inerentes à infeção por *C. difficile* e cujas toxinas constituem seus principais fatores de virulência. A toxina A é uma enterotoxina e a toxina B é uma citotoxina. Existem situações em que existe *C. difficile* nas fezes, mas este não é produtor de toxinas, logo, não é considerado patogénico. A pesquisa é qualitativa pois consiste num ensaio imunocromatográfico baseado em reações imunológicas efetuadas numa membrana de nitrocelulose por migração. O kit utilizado no LSJ é o Stick 2A-Bdiff / Simple 2A-Bdiff da OPERON e consiste em partículas de látex vermelhas conjugadas a um anticorpo específico que reage contra a toxina A. Para além deste conjugado, existe outro anticorpo específico para a toxina A que está fixo à membrana. O mesmo princípio é aplicado para a toxina B. Também existem partículas de látex azuis conjugadas a um antígeno específico e reconhecidos por um anticorpo específico fixo à membrana que vai servir como controlo do teste. A amostra recebe um pré-tratamento inicial com um tampão diluente para conseguir extrair as toxinas da matriz fecal. Após extração coloca-se um volume predefinido de sobrenadante na membrana que migra por capilaridade durante 15 minutos à temperatura ambiente. Quando a amostra flui pela membrana as partículas de látex coloridas migram e caso a amostra apresente as

⁷ Adaptado: <https://www.fishersci.com/shop/products/yersinia-selective-agar/p-4523654>

respetivas toxinas, estas serão “capturadas” pelos anticorpos específicos que estão fixos na membrana. Diferentes linhas serão observadas, consoante o conteúdo de toxinas da amostra. As linhas são usadas para interpretar o resultado. É de salientar que a linha de controlo do teste terá que estar sempre presente para conseguir validar o nosso resultado (Figura 9).

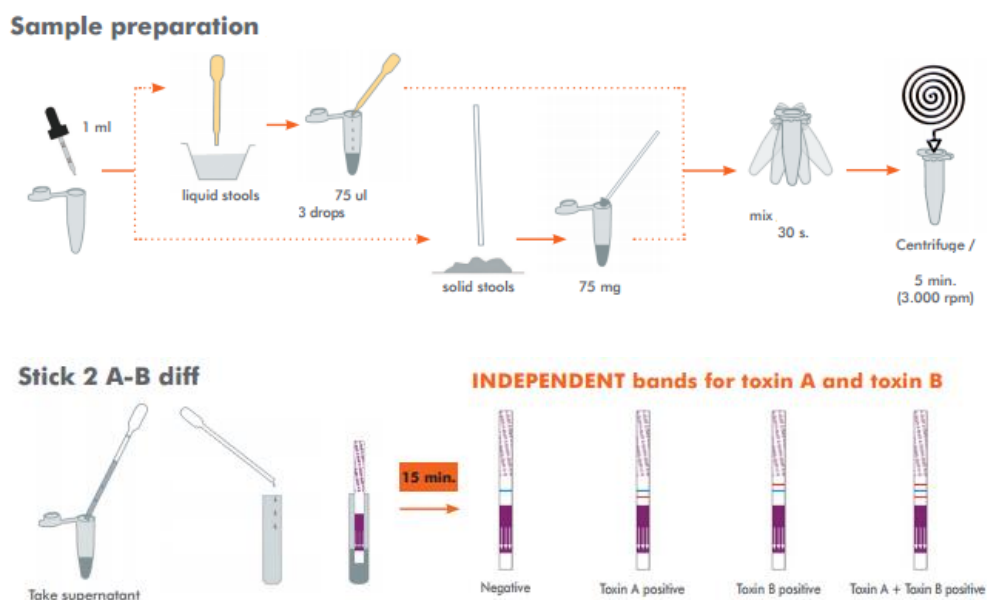


Figura 9: Esquema da preparação da amostra, execução e interpretação de resultados do teste imunocromatográfico para pesquisa de toxinas A e B de *C. difficile*⁸.

O rotavírus e adenovírus são os principais agentes causais de gastroenterites virais agudas em crianças [10]. A sua transmissão ocorre por via oro-fecal e a sua pesquisa também pode ser feita por ensaio imunocromatográfico onde anticorpos monoclonais específicos reagem contra proteínas virais.

No LSJ também é frequente solicitarem o exame parasitológico das fezes de forma a identificar trofozoítos, quistos e ovos de parasitas.

Para o exame parasitológico devem ser solicitadas 3 amostras, separadas, em dias alternados [13]. Estas amostras devem ser transportadas de imediato para o laboratório, se impossível, deverão ser refrigeradas até 12h a 4°C.

O diagnóstico parasitológico recai essencialmente na identificação das estruturas parasitárias. No LSJ este diagnóstico é feito pelo exame direto das fezes, utilizando soluto de Lugol para corar as estruturas parasitárias e pelo exame direto após concentração da amostra (Figura 10), pelo método de Ritchie (Anexo B). Após concentração, coloca-se uma pequena porção do sedimento numa lâmina com uma gota de soluto de Lugol e cobre-se com uma lamela.

⁸ Adaptado: <http://www.operon.es/sites/default/files/pdf/FIC-ENF-INF-GDH.2AB.pdf>

Com a objetiva de pequena ampliação (10x) é percorrida toda a área da lamela e caso seja detetada uma estrutura suspeita esta é focada com uma objetiva de maior ampliação (40x), para identificação da estrutura parasitária.

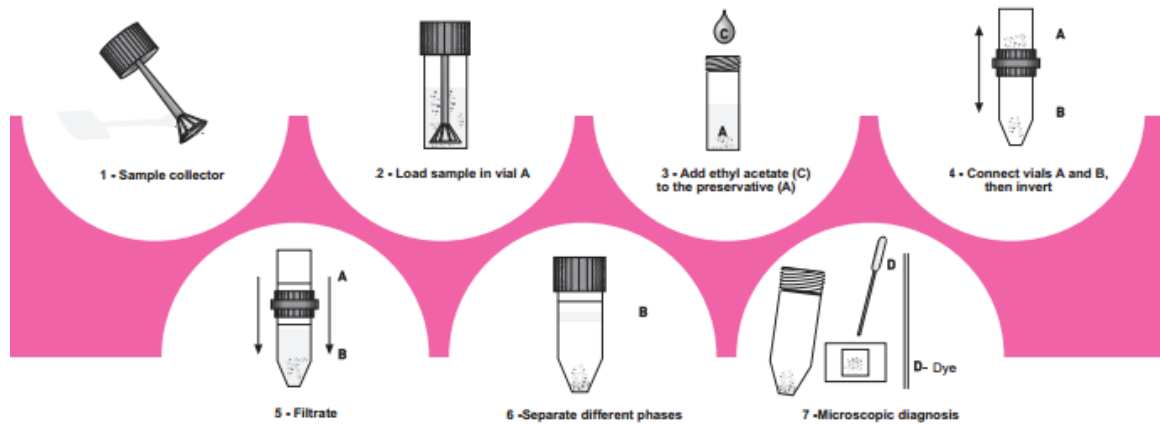


Figura 10: Esquemática do método Ritchie para concentração de parasitas⁹.

No LSJ também é realizada a pesquisa qualitativa de antígenos de *Giardia lamblia* por ensaio imunocromatográfico. O princípio do teste é semelhante ao da pesquisa de toxinas A e B de *Clostridium difficile*. Este teste utiliza anticorpos monoclonais específicos contra antígenos da *Giardia lamblia*, independentemente da forma que o parasita apresenta no seu ciclo de vida.

Quando é pretendida a pesquisa de ovos de *Enterobius vermicularis* a colheita da amostra deverá ser feita através do método de Graham. Este método consiste na aplicação de fita adesiva transparente nas pregas perianais. De seguida esta fita é colada numa lâmina para ser observada ao microscópio. A colheita deve ser feita de manhã, antes de efetuar a higiene, já que, a fêmea desta espécie desloca-se durante a noite até à região perianal para fazer a deposição dos ovos [10].

5.3. URINA

A urina é um fluido orgânico isento de bactérias até chegar à uretra. Na uretra existe uma flora comensal que é arrastada pela urina aquando a sua passagem. No entanto, a uretra pode servir como porta de entrada de microrganismos patogénicos. Amostras de doentes com suspeita de infeção do trato urinário constituem o tipo de amostra mais comum na maior parte dos laboratórios.

A colheita, acondicionamento e transporte da amostra são essenciais para garantir a fiabilidade dos resultados.

⁹ Adaptado: <http://www.monlab.com/descargas/pruebas%20rapidas/PARASITOLOGIA/easy-copros.pdf>

Para o diagnóstico de infecção urinária a colheita pode ser obtida de diferentes formas, desde que se mantenha as condições de assepsia e sempre de acordo com as indicações dadas pelo laboratório. A amostra deve ser colhida para um contentor esterilizado e pode provir de punção supra-púbica, saco coletor (crianças), drenagem de nefrostomia/uretostomia, punção de cateter ou colheita por micção do jacto médio. Esta última deverá ser idealmente a primeira urina da manhã por estar mais concentrada.

Após colheita para contentor esterilizado a urina deve ser transportada ao laboratório o mais rapidamente possível para ser processada até uma hora após a colheita. Caso não seja possível processar neste intervalo de tempo, deverá ser refrigerada a 4°C e processada assim que possível, nunca ultrapassando as 24h após a colheita [10].

A urina pode ser colhida para contentores estéreis contendo ácido bórico. O ácido bórico funciona como conservante e permite que a urina permaneça à temperatura ambiente até 24h após a sua colheita. É importante ter em atenção que é necessário respeitar as proporções de urina/conservante, já que, quando as urinas apresentam volumes muito reduzidos há possibilidade de haver falsos-negativos.

A urocultura consiste no exame citológico a partir do sedimento urinário e no exame cultural [12].

O exame citológico é um exame a fresco efetuado a partir do sedimento. Para tal, é necessário centrifugar aproximadamente 10 mL de urina a 1500 rpm durante 5 minutos. Seguidamente, despreza-se o sobrenadante, o sedimento é homogeneizado e é colocada uma gota deste entre lâmina e lamela. A observação com objetiva de 40x procura observar células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, cilindros, cristais, bactérias, fungos ou parasitas em pelo menos 10 campos diferentes. Os leucócitos e eritrócitos devem ser quantificados por campo.

Para o exame cultural a urina deverá ser homogeneizada, mas não centrifugada.

Para inocular os meios utiliza-se ansas de 1 μ L (0,001 mL) que são imersas verticalmente na urina. A utilização de ansas com volume predefinido permite calcular aproximadamente o número de unidades formadoras de colónias por mililitro de urina (ufc/mL), caso haja crescimento.

O meio utilizado para o exame cultural é o Brilliance UTI Clarity – (UTI), mas se for indicado também pode ser realizada sementeira em meio COLS+. Caso seja simultaneamente pedida análise micológica deveremos inocular no meio Sabouraud com gentamicina e cloranfenicol - (SAB GC).

Os meios são inoculados pela técnica de esgotamento do produto por extensão à superfície do meio sólido e são incubados a 37°C em atmosfera de aerobiose durante 18-24h.

O meio UTI (Figura 11) é um meio cromogénico, não seletivo, que permite uma fácil e rápida deteção, diferenciação e identificação presuntiva de microrganismos que habitualmente originam infeções do trato urinário. Este meio contém substratos cromogénicos que quando reduzidos por enzimas específicas produzem colónias pigmentadas com diferentes tonalidades consoante a estirpe [11].

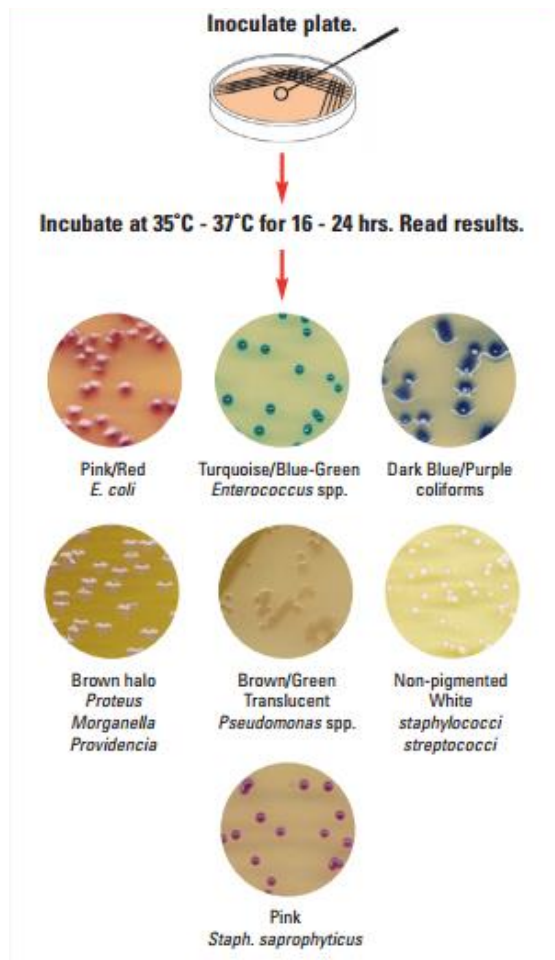


Figura 11: Meio para urocultura – Brilliance UTI clarity com diferentes estipes que originam infeções do tracto urinário e seus pigmentos característicos neste meio cromogénico¹⁰.

Após incubação são contabilizados o número de colónias, ou seja, como a ansa utilizada é de 1 µL, contabiliza-se o número de colónias que cresceram e este número é multiplicado por 1.000, convertendo assim a unidade microlitro em mililitro. Este valor é indicativo do número de colónias por mililitro de urina. A seguir procede-se à identificação do microrganismo isolado e à realização do TSA conforme o protocolo do laboratório.

¹⁰ Adaptado: http://www.oxid.com/pdf/24021_oxid_clarity_UTI.pdf

A valorização dos resultados deverá considerar uma série de parâmetros tais como o tipo de colheita, tipo de paciente, sinais e sintomas do paciente, observação microscópica do sedimento urinário, exames bacteriológicos anteriores, entre outros (**Tabela 14**).

Tabela 14: Critérios para o diagnóstico de infeções urinárias de acordo com as *guidelines* da Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas. (legenda: ufc – Unidades formadoras de colónias; WBC – leucócitos) [24].

Designação	Critérios laboratoriais
Bacteriúria assintomática	> 10 WBC/mm ³ > 10 ⁵ ufc/mL em duas amostras consecutivas com um intervalo > 24 h
Infeção urinária aguda não complicada em mulheres	> 10 WBC/mm ³ > 10 ³ ufc/mL
Pielonefrite aguda não complicada	> 10 WBC/mm ³ > 10 ⁴ ufc/mL
Infeção urinária complicada	> 10 WBC/mm ³ > 10 ⁴ ufc/mL (homens) > 10 ⁵ ufc/mL (mulheres)
Infeção urinária recorrente	> 10 ³ ufc/mL

Quando se verifica crescimento de duas ou mais estirpes, considera-se que a técnica de colheita não foi adequada, ou provavelmente houve atraso no transporte e/ou no processamento da amostra. Nestas situações sugere-se o envio de nova amostra.

Sempre que a colheita seja realizada por punção supra-púbica e excluindo possíveis contaminações por bactérias comensais da pele, quaisquer espécies de bactérias isoladas independentemente da sua quantificação deverão ser valorizadas.

O meio SBA GC é seletivo para fungos constituído por peptonas, fonte de azoto e altas concentrações de glicose, fonte de energia para o crescimento dos microrganismos. O pH ácido e as altas concentrações de glicose não são toleráveis para a maioria das bactérias. O cloranfenicol e a gentamicina são antibióticos de largo espectro que funcionam inibindo uma grande variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas [11]. O meio deverá ser incubado durante 24h a 37°C. Caso haja crescimento de colónias, deverá confirmar-se o resultado a partir dum exame direto observado ao microscópio.

5.4. EXSUDATOS PURULENTOS E LÍQUIDO DE SEROSAS

Os fluidos serosos (pleural, peritoneal, pericárdico e sinovial) são habitualmente estéreis, logo, sempre que é encontrado qualquer microrganismo este deverá ser identificado. A interpretação final deverá ter em consideração o contexto clínico do paciente, assim como, o microrganismo isolado [10].

A colheita da amostra deverá seguir sempre uma técnica asséptica e o transporte deverá ser feito em função do microrganismo que queremos pesquisar. Em contentor esterilizado, seringa ou zaragatoa, esta última com meio de transporte que preserve a flora bacteriana da amostra para pesquisa de aeróbios ou fungos, como é o meio Amies ou Stuart. Quando pretendida a pesquisa de microrganismos anaeróbios, deverá ser utilizado um meio de transporte próprio, portagerm™, meio semi-sólido, tamponado numa atmosfera isenta de oxigénio, com agentes redutores e com indicador de oxidação-redução, o que permite que a amostra não perca viabilidade para ser processada adequadamente e em conformidade.

Numa fase inicial o processamento da amostra inclui uma observação e descrição do aspeto macroscópico da amostra. Os líquidos lípidos são centrifugados durante 15 minutos a 1500g e é utilizado o sedimento para aumentar as hipóteses de encontrar microrganismos. Caso a amostra seja purulenta não será necessário centrifugar, podendo ser a amostra inoculada diretamente no meio de cultura. Caso a amostra esteja coagulada, será necessário proceder à sua homogeneização.

Seguidamente, procede-se à preparação de um esfregaço que é fixado pelo calor e corado pela técnica de Gram para realizar o exame direto. Para o exame cultural inocula-se os diferentes meios de cultura, semeando pela técnica de esgotamento do produto por extensão à superfície do meio sólido, de forma a obter colónias isoladas.

Os meios de cultura utilizados são o Brain Heart Infusion Broth – (BHI), COLS+, CHOVC e UTI.

O meio BHI é um meio líquido de enriquecimento que permite a recuperação e crescimento de todos os microrganismos. A sua composição consiste em extrato de cérebro e coração, assim como peptonas, glicose e fosfato [11]. Este meio é incubado a 37°C e caso se verifique turvação do meio, significa que há crescimento bacteriano. Efetua-se seguidamente um esfregaço que será corado pela técnica de coloração de Gram e inocula-se em meio sólido adequado, de acordo com a suspeita clínica. Na pesquisa de anaeróbios, a repicagem deverá ser feita para uma gelose de sangue e incubado numa atmosfera isenta de oxigénio

conseguida com câmaras, jarras GasPak ou bolsas de anaerobiose durante 24-48h à temperatura de 37°C.

A gelose de sangue e a gelose de chocolate devem ser incubadas em atmosfera capnófila (5% de CO₂) a 37°C durante 18-24h. O meio UTI e o meio BHI devem ser incubados a 37°C em aerobiose, este último no mínimo 48h.

Caso seja pretendida uma pesquisa de fungos a amostra deverá ser inoculada em meio SAB GC e ser incubado durante 24h a 37°C. Caso não haja crescimento, deverá permanecer até 4 semanas para ser considerada negativa. No caso de haver crescimento de colónias, deverá confirmar-se o resultado a partir dum exame direto observado ao microscópio.

Após isolar e identificar os potenciais microrganismos patogénicos, deverá ser feito o TSA segundo o protocolo estabelecido pelo laboratório.

5.5. LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO

O LCR é um líquido estéril. Este líquido colhido por punção lombar deve ser estudado quanto ao seu aspeto, composição química, celularidade e análise microbiológica [10].

Após a colheita, a amostra deverá ser transportada em contentor estéril e mantida à temperatura ambiente para ser processada. Caso não seja processada de imediato, deve ser colocada na estufa a 37°C para garantir a viabilidade dos microrganismos, não devendo nunca ser refrigerada.

Só em situações onde apenas são pedidos estudos virais é que pode ser refrigerada.

A amostra deve ser centrifugada durante 20 minutos a 1500g para obter um sedimento que permita aumentar as probabilidades de encontrar microrganismos.

Para o exame microscópico direto colocam-se 1 ou 2 gotas do sedimento sobre uma lâmina previamente limpa com álcool e fixa-se para de seguida ser corada pela técnica de coloração de Gram.

O líquido é semeado utilizando uma pipeta esterilizada para inocular os meios BHI, COLS+, CHOVC e SAB GC.

Os meios COLS+ e CHOVC devem ser incubados a 37°C em atmosfera capnófila (5% de CO₂) durante 72h e as culturas observadas diariamente.

O meio BHI e o meio SAB GC são incubados a 37°C em aerobiose durante 24-48h. A passagem de inóculo do meio líquido de enriquecimento para meios sólidos adequados

deverá ser feito após 24-48h de incubação, devendo ser acompanhado de um exame direto corado pelo Gram.

O crescimento de microrganismos neste tipo de amostra é sempre significativo. O isolado deve ser identificado e realizado o respectivo TSA conforme o protocolo estabelecido pelo laboratório.

5.6. EXSUDATOS VAGINAIS / URETRAIS

As culturas de material genital devem ser feitas em doentes que apresentem sinais de infecção genital localizada ou suspeita de doença sexualmente transmissível (DST) [10].

É importante que a colheita seja enviada em meio de transporte adequado e que seja processada o mais depressa possível. Caso não seja possível processar de imediato, poderão ser refrigeradas, desde que se tenha em consideração qual o microrganismo que se pretende identificar.

Será necessário proceder a um exame direto a fresco, de forma a observar a presença de *Trichomonas vaginalis* ou elementos leveduriformes.

Também deverá ser feito um esfregaço corado pela técnica de coloração de Gram, de forma a caracterizar a flora existente e verificar a existência de leucócitos e possíveis *clue-cells*.

As *clue-cells* são células epiteliais revestidas por bacilos pleomórficos e variáveis ao Gram. Quando se observam estas células estamos perante uma infecção por *Gardnerella vaginalis* [13].

Os produtos devem ser semeados pela técnica de esgotamento por extensão à superfície do meio sólido nos seguintes meios: COLS+, CHOCV e UTI. Se for solicitado também poderá ser feita uma cultura em SAB GC, para a pesquisa de fungos leveduriformes. A gelose de sangue e a gelose de chocolate são incubadas em atmosfera capnófila (5% de CO₂) e os outros meios apenas em aerobiose a 37°C, durante 18-24h. Após incubação, deverá ser feita a identificação do microrganismo e respectivo TSA conforme o protocolo estabelecido pelo laboratório.

É de salientar que a valorização clínica das culturas deverá ter em consideração a informação clínica do paciente, assim como o exame direto.

5.7. SECREÇÕES RESPIRATÓRIAS

Quando há suspeita de infeções do trato respiratório inferior são várias as amostras que podem chegar ao laboratório. Estas amostras incluem expectoração, lavados ou aspirados brônquicos e aspirado transtraqueal.

A expectoração é a amostra mais comum. Este produto biológico é composto por células de descamação, muco rico em fibrina, leucócitos e bactérias.

É importante que as amostras que chegam ao laboratório sejam representativas do produto que vamos estudar, isto é, não deve ser só saliva. Também é muito importante evitar a contaminação com flora comensal do trato respiratório superior.

O tratamento laboratorial pode consistir num exame bacteriológico ou pesquisa de micobactérias, conforme se pretenda diagnosticar uma infeção bronco-alveolar ou tuberculose pulmonar, respetivamente.

É importante, que a colheita da expectoração seja matinal. Isto porque à noite a acumulação de secreções é maior e assim haverá maior probabilidade de encontrar o microrganismo que está a originar a infeção.

O tempo que medeia a colheita e a sua chegada ao laboratório deverá ser o mais curto possível. Quando a amostra chega ao laboratório deve-se fazer um exame direto que irá ser corado pela técnica de Gram. Para tal, escolhe-se uma parte purulenta ou hemoptótica para fazer o esfregaço por estiramento. De seguida, observa-se ao microscópio ótico com objetiva de 10x (pelo menos 10 campos), de modo a conseguir avaliar a qualidade da amostra, tendo em conta a presença de células epiteliais pavimentosas da orofaringe e leucócitos. Uma amostra válida deverá ter um numero igual ou superior a 25 polimorfonucleares/campo e menos que 25 células epiteliais/campo. Quando a amostra não é viável, deverá ser pedida uma nova amostra. Se a amostra for viável, procede-se ao exame cultural [19].

Os meios empregues para o exame cultural são o COLS+, CHOCV e UTI. Se for solicitado, também poderá ser feita uma cultura em SAB GC, para a pesquisa de fungos. Estes meios são semeados pela técnica de esgotamento por extensão à superfície do meio sólido. A gelose de sangue e a gelose de chocolate são incubadas em atmosfera capnofílica e o meio SAB GC e UTI em aerobiose a 37°C , durante 18-24h. O meio SAB GC poderá permanecer até 4 semanas. Após incubação, deverá ser feita a identificação do microrganismo e respetivo TSA conforme o protocolo estabelecido pelo laboratório.

Durante o meu período de estágio não foi solicitada para nenhuma amostra a pesquisa de micobactérias, no entanto, gostaria de fazer uma pequena referência a este tipo de amostra e o tratamento da mesma. Estas amostras devem seguir um protocolo específico. É conveniente que sejam feitas colheitas de 3 dias consecutivos, já que, as micobactérias são microrganismos cuja emissão não é constante e a sua concentração é baixa.

A sua pesquisa inclui inicialmente processos de homogeneização, fluidificação, descontaminação e concentração de eventuais BAAR. É também necessário efetuar um esfregaço feito a partir do sedimento obtido após a homogeneização, assim como, proceder à cultura em meio adequado [10] [13].

As micobactérias possuem uma parede celular de composição predominantemente lipídica. Considera-se que este facto esteja na base da ácido-álcool resistência e da sua resistência a agentes descontaminantes e desidratação. Os BAAR quando corados pela técnica de Ziehl-Neelsen aparecem como bacilos púrpura-vermelhos, curtos ou compridos, formando “cordas”. Para além da técnica de Ziehl-Neelsen, existem outras técnicas afins que se podem utilizar na pesquisa de micobactérias.

A cultura deve ser feita em meio adequado, como por exemplo o meio de Lowenstein. Este é um meio seletivo que contém na sua constituição verde malaquite que inibe o crescimento de contaminantes que possam ter sobrevivido ao processo inicial de descontaminação. Contém também proteínas provenientes do ovo, permitindo a produção de niacina para assim diferenciar certas estirpes. A cultura deve permanecer incubada em aerobiose a 37°C durante pelo menos 42 dias, aproximadamente, só após este período é que se pode considerar a cultura negativa. Caso se verifique crescimento, as colónias suspeitas têm aspeto de “couve-flor”.

É importante referir que as amostras consideradas estéreis apenas necessitam ser submetidas ao processo de concentração, sem passar pelas fases de liquefação/descontaminação.

5.8. EXSUDATO OROFARINGE

Habitualmente a faringite de origem bacteriana é provocada por *Streptococcus* beta-hemolíticos do grupo A, não entanto, existem outros agentes como a *Neisseria gonorrhoeae*, *Bordetella pertussis* e *Corynebacterium diphtheriae* que podem estar na origem da infeção [10]. A pesquisa destes últimos agentes só deve ser feita caso a situação clínica do paciente assim o justifique e seja especificamente solicitado pelo clínico.

Deve-se colher duas zaragatoas. Uma deverá ser transportada em meio de Amies ou Stuart para ser processada no exame cultural e a outra, que não precisa de meio de transporte, vai ser utilizada para a pesquisa qualitativa de antigénio (polissacarídeo da parede celular) do *Streptococcus* beta-hemolítico do grupo A por imunocromatografia.

A amostra deve ser inoculada em meio COLS+ ao qual foi adicionado um disco de bacitracina e incubada a 37°C durante 18-24h em aerobiose. O *Streptococcus pyogenes* são sensíveis à bacitracina.

Os microrganismos isolados devem ser identificados. Se existir crescimento de flora endógena normal esta deverá ser relatada, já que, pode dar origem a resultados falsos-negativos. Após identificação do microrganismo isolado, realiza-se o TSA conforme o protocolo do laboratório.

5.9. PESQUISA DE *Streptococcus* DO GRUPO B

O *Streptococcus agalactiae* é uma bactéria extremamente comum que coloniza as regiões vaginais e rectais das mulheres.

Por ser um dos agentes que causa infeções graves em recém-nascidos, nomeadamente, meningite, pneumonia e sépsis, é importante pesquisar durante a gravidez se a mãe é portadora assintomática e assim tomar as medidas necessárias para evitar a infeção do filho.

A pesquisa é feita às 35-37 semanas de gestação e são necessárias colher duas amostras. Uma amostra de exsudato vaginal e outra de exsudato rectal. Estas amostras são colhidas com zaragatoa e transportadas em meio de transporte [10].

As amostras são inoculadas pela técnica de esgotamento por extensão da superfície do meio sólido no meio Brillance GBS – (GBS) (Figura 12). Este meio é seletivo e cromogénico para a identificação presuntiva de *Streptococcus* do grupo B. De seguida é colocada a zaragatoa no caldo BHI. Ambos os meios são incubados a 37°C durante 18-24h. No dia seguinte é reinoculada a zaragatoa no meio GBS, seguindo-se nova incubação a 37°C durante 18-24h. O objetivo é isolar e identificar o agente patogénico.

As colónias de *Streptococcus agalactiae* crescem produzindo colónias rosa/salmão, enquanto que, colónias de estirpes cujo crescimento não foi inibido, mas que não são *Streptococcus agalactiae* produzem colónias azuis ou roxas. As colónias rosa/salmão que presuntivamente são positivas devem ser sujeitas a confirmação por aglutinação em látex.



Figura 12: Meio Brilliance GBS com crescimento de colônias de *Streptococcus agalactiae*¹¹.

5.10. DIAGNÓSTICO DE MICOSES SUPERFICIAIS

As micoses superficiais apenas estão limitadas à pele e/ou mucosas. As mais frequentes na prática clínica são as dermatofitoses, candidose e pitiríase versicolor [17].

Um correto diagnóstico vai depender essencialmente da colheita e transporte adequado da amostra (raspados de pele ou unhas e cabelos – dermatófitos e amostras da cavidade oral, pequenas e grandes pregas, ungueal e mucosa genital – por leveduras do gênero *Candida*), observação do exame microscópico direto, cultura e posterior identificação.

A observação do exame microscópico direto a fresco entre lâmina e lamela com adição de hidróxido de potássio (KOH) é de grande utilidade. A adição de KOH dissolve a queratina e muco, ficando as estruturas celulares em destaque. A visualização ao microscópio é feita com a objetiva de 40x e procura observar fragmentos micelares ou presença de leveduras, cujas estruturas apresentam um brilho fluorescente [16].

A cultura deverá ser feita em meio de SAB GC (Figura 13) e incubada a 37°C em aerobiose. A cultura deverá ser observada a cada 24h. Caso não haja crescimento, deverá permanecer até 4 semanas para ser considerada negativa.

A identificação do microrganismo potencialmente patogénico deverá ser feita pelo aspeto cultural e observação microscópica.

¹¹ Fonte: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/PO5320A?ICID=search-product>



Figura 13: Meio de Sabouraud com Cloranfenicol e Gentamicina para crescimento de fungos¹².

5.11. IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS

Após inoculação e incubação nos meios de cultura adequados, as colónias de microrganismos que foram isolados e que sejam de valorizar consoante a clínica do paciente e o local anatómico de onde foi colhida a amostra, é que devem ser identificados e submetidos a testes de suscetibilidade a antimicrobianos (TSA).

A identificação consiste inicialmente numa identificação macroscópica das características culturais das colónias que cresceram nos meios de cultura, assim como, uma avaliação da morfologia das bactérias a partir do exame microscópico de preparações coradas (identificação da forma e afinidade para corantes). Pela coloração diferencial de Gram devemos avaliar se a bactéria é Gram positiva ou Gram negativa. Só após esta informação inicial é que devemos avançar para uma segunda fase que consiste em provas de identificação bioquímica que permitem orientar para a correta identificação do microrganismo, consoante as suas características metabólicas.

Existem laboratórios que utilizam equipamentos automáticos para realizar esta segunda fase, no entanto no LSJ esta fase é unicamente feita recorrendo a procedimentos manuais.

5.11.1 HEMÓLISE

Consoante a capacidade que algumas estirpes tem de lisar os glóbulos vermelhos, quando estas são cultivadas em gelose de sangue, o meio pode apresentar características diferentes ao redor das colónias. Se fizerem hemólise total e apresentarem um halo incolor, são consideradas beta-hemolíticas. Se apenas apresentarem uma clarificação parcial do meio, com um tom esverdeado, são denominadas alfa-hemolíticas. Caso se verifique ausência de hemólise, então são consideradas gama-hemolíticas [16].

¹² Adaptado: <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/46-sabouraud-gentamicin-chloramphenicol-2-agar>

5.11.2 OXIDASE

Esta prova permite detetar a presença duma enzima intracelular, a citocromo oxidase. Na presença de oxigénio e de citocromo C, esta enzima vai oxidar um corante redox, o tetrametil-p-fenilenodiamina, o qual é reduzido para um composto púrpura, o indolfenol. Para tal, espalha-se com uma ansa descartável um inóculo da colónia suspeita sobre uma tira de papel de filtro (Whatman nº1 ou equivalente), humedecido com o tetrametil-p-fenilenodiamina e aguarda-se entre 10-60 segundos o aparecimento da cor. Esta enzima está presente nas espécies de *Neisseria*, *Aeromona*, *Vibrio* e para a maioria das *Pseudomonas*. As *Enterobacteriaceae*, assim como outros bacilos Gram-negativos são oxidase-negativa [13].

5.11.3 CATALASE

O peróxido de hidrogénio (H_2O_2) é um produto resultante do metabolismo celular ou da fagocitose, e em excesso torna-se tóxico para as bactérias. Existem bactérias que possuem uma enzima, a catalase, capaz de converter o H_2O_2 em oxigénio e água [16].

A pesquisa da catalase faz-se colocando sobre uma lâmina de vidro, uma gota de H_2O_2 à qual se junta uma colónia bacteriana suspeita. Se houver formação de bolhas, significa que há libertação de O_2 e que a enzima catalase está presente. A presença desta enzima é comum nas estirpes de *Staphylococcus spp.* e está ausente nas estirpes de *Streptococcus spp.* Deve-se evitar ao colher a colónia carregar também meio de cultura, especialmente se este for gelose de sangue, já que, reações falso-positivas podem ocorrer, pois os glóbulos vermelhos possuem a enzima catalase.

5.11.4 COAGULASE

A forma mais fácil de identificar *Staphylococcus aureus* é a prova da coagulase. Esta enzima pode existir tanto na sua forma livre, assim como, ligada à parede da célula bacteriana. A coagulase ligada à parede reage diretamente com o fibrinogénio e converte-o em fibrina. A produção de coagulase livre geralmente ocorre quando o microrganismo é inoculado em meio líquido, atuando sobre protrombina e formando um complexo que atua sobre o fibrinogénio que é transformado em coágulo de fibrina [16][19].

A pesquisa da coagulase no LSJ é feita utilizando uma pequena fração de plasma num tubo, que vai ser inoculado com algumas colónias bacterianas. O tubo é incubado a 37°C, no mínimo 4h até 24h. A formação de um coágulo no plasma indica produção de coagulase.

Além de *S. aureus*, há outras espécies de estafilococos que produzem coagulase, mas estas espécies raramente causam infeções no Homem.

5.11.5 INDOL

Alguns microrganismos possuem enzimas intracelulares, as triptofanases, com capacidade para degradar o triptofano (aminoácido) em indol e outros produtos metabólicos.

A reacção do indol consiste na adição de um aldeído, que em combinação com o indol forma um produto corado [13].

No LSJ é colocada uma ou duas gotas do reagente de JAMES sobre um papel de filtro (Whatman nº1 ou equivalente) e esfrega-se com uma ansa uma colónia pura sobre o papel de filtro saturado com reagente. Se aparecer uma coloração rosa-purpura é considerada positivo para a reacção.

5.11.6 FERMENTAÇÃO DO MANITOL

Para distinguir *S. aureus* de outras espécies de *Staphylococcus*, podemos utilizar um meio seletivo, o meio de Chapman. Este meio contém manitol e uma elevada concentração de cloreto de sódio. O indicador de pH é o vermelho de fenol. Quando as colónias fermentam o manitol, o meio torna-se amarelo ao redor das mesmas, consequência da libertação de ácido que baixa o pH. Se a reacção for negativa o meio permanece avermelhado. O *S. aureus* tem capacidade de fermentar manitol [16].

5.11.7 TESTE CAMP

Este teste permite a identificação presuntiva de *Streptococcus* do Grupo B (*Streptococcus agalactiae*), já que, este estreptococo beta-hemolítico é o único capaz de dar um teste de CAMP positivo. O fator CAMP é uma proteína extracelular produzida pelo *S. agalactiae*, que aumenta a atividade da beta-hemolisina que é produzida pela maioria das estirpes de *S.aureus* [16].

Para tal, deve-se inocular uma estria única de uma amostra de *Staphylococcus aureus* no centro de uma placa de gelose de sangue. De seguida formando um ângulo recto com a estria de inoculação do *S.aureus*, inocula-se a amostra a ser testada, ficando próximas, mas nunca tocando as estrias entre si. Se se verificar que se trata dum *S. agalactiae*, observa-se um alargamento da zona de lise, que adquire a forma duma seta, nos locais próximos onde estas estirpes foram semeadas (Figura 14).

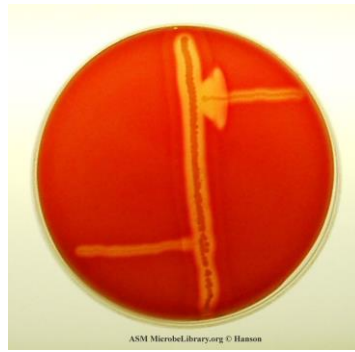


Figura 14: Representação do teste de CAMP para a identificação de *Streptococcus* do grupo B¹³.

5.1.1.8 PROVA DA SENSIBILIDADE À OPTOQUINA

A optoquina é uma substância que inibe o crescimento de *Streptococcus pneumoniae*, ao contrário de outros *Streptococcus* alfa-hemolíticos [13].

Para a realização desta prova seleciona-se uma colónia bem isolada do microrganismo a ser testado e faz-se uma suspensão em soro fisiológico. De seguida, pelo método de sementeira em toalha inocula-se uma placa de gelose de sangue. Com ajuda de uma pinça estéril, coloca-se um disco de optoquina no centro da placa e incuba-se a 37°C durante 18-24h em atmosfera capnófila. O aparecimento de uma zona de inibição igual ou superior a 14 milímetros, significa que a bactéria é sensível à optoquina, ou seja, estamos presente um *S. pneumoniae*.

5.1.1.9 FERMENTAÇÃO DE AÇÚCARES

Esta prova permite distinguir o mecanismo oxidativo ou fermentativo na utilização de hidratos de carbono pelas bactérias.

Algumas bactérias conseguem metabolizar os hidratos de carbono produzindo ácido apenas em condições aeróbias, enquanto outras o conseguem tanto em condições aeróbias como anaeróbias.

No LSJ procede-se ao estudo da fermentação da glicose e da lactose utilizando o meio de Kligler. Este meio é um meio diferencial que permite a identificação de *Enterobacteriaceae* e é constituído por peptonas, assim como, por hidratos de carbono fermentáveis, glicose e lactose, sendo a concentração de glicose de apenas 10%. O indicador de pH é o vermelho de fenol. Possui também tiosulfato de sódio e citrato férrico amoniacal para detetar a produção de sulfureto de hidrogénio (H₂S). Este meio é um meio semi-inclinado e a inoculação do meio com os microrganismos que queremos identificar faz-se por picada central até ao fundo do meio, seguido de extensão na superfície [11]. Incuba-se em aerobiose durante 18-24h a 37°C.

¹³ Adaptado: <http://microbesinfo.com/2013/07/camp-test-christie-atkins-and-munch-peterson-test/>

A fermentação dos hidratos de carbono produz ácidos que são detetados pela mudança de cor do indicador de pH, que vira de vermelho para amarelo. A produção de sulfureto de hidrogénio pelas bactérias evidencia-se pela formação dum precipitado negro e a capacidade de produção de gás é visível pela formação de bolhas, fragmentação ou deslocamento do meio.

A interpretação dos resultados deve ser feita pelo registo das reações ocorridas no fundo do meio, na superfície inclinada, assim como, a produção de gás e de sulfureto de hidrogénio.

Se a superfície do meio está alcalina (vermelho) e o fundo ácido (amarelo), o microrganismo só fermenta a glicose. Isto ocorre porque as enzimas do metabolismo da glicose são constitutivas, e as bactérias obtêm o máximo de energia a partir do açúcar mais simples. A utilização da glicose ocorre aerobicamente na superfície do meio onde existe oxigénio como aceitador final dos eletrões, mas também pode ocorrer anaerobicamente no fundo do meio. Se o microrganismo em causa não fermentar a lactose, que está no meio com uma concentração superior à concentração de glicose, a partir do momento em que se esgota a glicose à superfície, ocorre oxidação dos ácidos produzidos em aerobiose, tornando o meio alcalino na superfície, o que confere uma cor vermelha.

Se a superfície está ácida e o fundo também, então o meio apresenta uma cor amarela e diz-se que as bactérias fermentam tanto a glicose como a lactose.

Caso se trate de bactérias que não fermentam nem glicose, nem lactose, o meio apresentará uma cor vermelha tanto na superfície como no fundo.

5.11.10 PROVA DA SENSIBILIDADE À BACITRACINA

Esta prova avalia a sensibilidade dos microrganismos à bacitracina, permitindo distinguir *Streptococcus* do grupo A dos restantes *Streptococcus* beta-hemolíticos. A sementeira em toalha deverá ser feita em gelose de sangue. Coloca-se um disco de bacitracina na placa inoculada e incuba-se a 37°C durante 18-24h em aerobiose e ausência de CO₂. A identificação presuntiva de *S. pyogenes* ocorre se se observar qualquer halo de inibição.

5.11.11 HIDRÓLISE DA ESCULINA BÍLIS

Esta prova permite identificar bactérias que hidrolisam a esculina em esculetina e glicose, sejam eles *Streptococcus* do grupo D de Lancefield, assim como, *Enterococcus spp.*

Utiliza-se um meio diferencial contendo esculina e bílis. A esculina quando convertida em esculetina difunde-se no meio que contém citrato férrico amoniacal e forma um complexo

preto-acastanhado. A bÍlis serve para inibir cocos Gram positivos que não sejam *Enterococcus* / *Streptococcus* do grupo D (Figura 15) [11].

Os *Enterococcus* também têm a particularidade de crescerem em meios com elevado teor de NaCl, sendo esta prova da tolerância, realizada muitas vezes em simultâneo para distinguir os *Enterococcus* dos *Streptococcus* do grupo D.

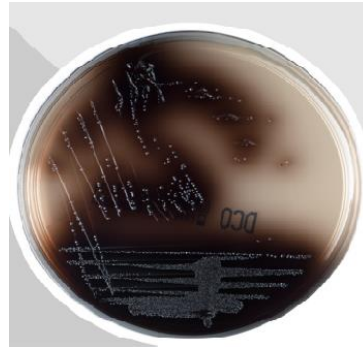


Figura 15: Meio Esculina Bilis com crescimento de *E. faecalis*. Precipitado de iões de ferro de cor preto-acastanhado à volta das colónias¹⁴.

5.11.12 SISTEMAS DE IDENTIFICAÇÃO MANUAL

No LSJ são usados sistemas de identificação manual para *Enterobacteriaceae*, o Oxoid™ Microbact™ GNB (Figura 16). Este sistema consiste em tiras que contém uma série de substratos geralmente utilizados pelas bactérias. Com este sistema podem ser realizadas 24 reações bioquímicas em simultâneo.

Após uma suspensão do microrganismo suspeito e respetiva inoculação nos poços da tira, incuba-se a 37°C entre 18-24h. Para algumas das reações será necessário adicionar óleo mineral no momento da inoculação. Após incubação, existem reações que são de leitura e interpretação direta, mas para outras será necessário adicionar reagentes específicos em determinados poços para se darem as respetivas reações e proceder à sua interpretação. A utilização dos diferentes substratos para reações específicas leva à mudança de cor e vai orientar na identificação da bactéria.

O resultado das várias reações bioquímicas pode ser transformado num código numérico que consta numa base de dados e que identifica a estirpe estudada.

¹⁴ Adaptado: <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/33-d-coccosel-agar>

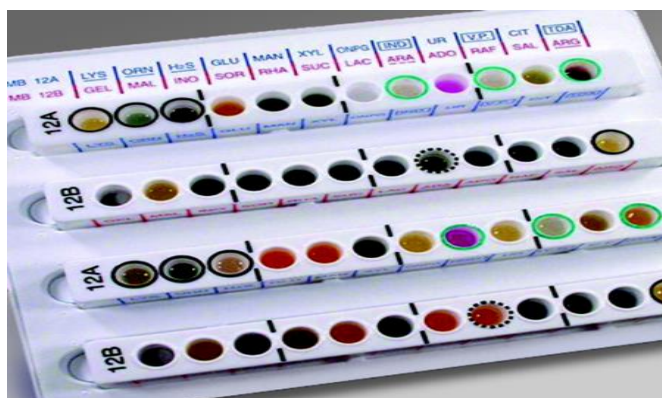


Figura 16: Sistema de identificação Oxoid™ Microbact™ GNB Kit¹⁵.

5.12. TESTES DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Consoante o produto biológico em estudo e o género da espécie isolada em cultura, o LSJ definiu um conjunto de antimicrobianos a serem testados. O método utilizado é a difusão em disco ou Kirby-Bauer. Este método é um método qualitativo que permite caracterizar a suscetibilidade do microrganismo ao antimicrobiano em sensível, intermédia ou resistente [13].

Este método utiliza uma suspensão bacteriana obtida a partir de colónias puras suspensas em soro fisiológico estéril e com turvação correspondente a 0,5 McFarland (podendo ser outra, se assim for recomenda). A seguir, inocula-se num meio de Mueller-Hinton, meio que está estandardizado para os testes de suscetibilidade a antimicrobianos, pela técnica de Kirby Bauer. A sementeira é feita pela técnica de sementeira em toalha. Deixa-se secar o inóculo, nunca excedendo os 15 minutos e aplicam-se os discos de papel impregnados com antibióticos de determinadas concentrações previamente conhecidas. De seguida o meio é incubado durante 18-24h em aerobiose a 37°C.

Os procedimentos para alguns microrganismos são diferentes da generalidade. Por exemplo, *Haemophilus* spp, devem ser inoculados em meio de Mueller-Hinton suplementado com 5% de sangue de carneiro e as *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis* em gelose de chocolate com 1% de suplemento de crescimento. Ambos os meios devem ser incubados em atmosfera capnófila a 37°C e durante 18-24h.

A validade deste teste é dada pela observação da distribuição do inóculo na placa e pelos halos de inibição formados. A avaliação das resistências a cada antimicrobiano é feita por defeito com base nos halos de inibição estabelecidos pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST).

¹⁵ Adaptado: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/MB1074A>

5.13. CASO CLÍNICO

O tipo de amostra que chega com maior frequência ao sector de Microbiologia é urina, por isso, optei por apresentar um caso que apareceu no laboratório, a fim de discutir também um pouco a necessidade da utilização adequada de antibióticos, evitando o surgimento de estirpes resistentes, assim como, adotar medidas que promovam a prevenção e controlo da infeção e que diminuam a transmissão destas estirpes entre a população.

5.13.1 CASO CLÍNICO V

Utente de 86 anos, sexo masculino, residente numa residência para idosos, foi-lhe pedido um exame bacteriológico de urina. Os resultados são apresentados na **Tabela 15**.

Tabela 15: Valores correspondentes ao caso clínico V.

Urina, bacteriológico		Resultados			
Exame citológico	Células epiteliais	Algumas			
	Leucócitos	70 /campo			
	Piócitos	10/campo			
	Eritrócitos	10/campo			
	Cilindros hialino-granulosos	-			
	Proteínas	(+---)			
Exame direto ao Gram		Encontraram-se bacilos negativos ao Gram			
Exame cultural	Identificação	<i>Klebsiella pneumoniae</i>			
	Contagem de colónias	10 ⁶ bactérias/mL			
	TSA	Sensível		Resistente	
		1º abordagem	2ª abordagem	1º abordagem	2ª abordagem
		Fosfomicina	Polimixina B/ Colistina	Amoxicilina; Amoxicilina+Ác. Clavulânico; Cefalexina; Cefuroxima sódica; Ceftriaxone; Norfloxacin;a; Cotrimoxazole; Doxiciclina; Aztreonam; Meropeneme	Piperacilina/Tazobactam; Levofloxacina; Ciprofloxacina; Cefotaxima; Tobramicina; Imipenem
Estirpe multirresistente produtora de carbapenemases					

O exame citológico mostra que a urina apresenta elementos celulares, eritrócitos e piócitos, cuja presença é característica de infecção. A infecção urinária foi confirmada por exame cultural e exame direto ao Gram, tendo sido identificada a estirpe *Klebsiella pneumoniae* (bacilos Gram negativos que pertencem à família das *Enterobacteriaceae*). Numa primeira abordagem, foi feito um TSA utilizando um conjunto de antibióticos que normalmente são utilizados no TSA para Enterobactérias que usualmente provocam infecções urinárias. Verificou-se que esta estirpe era resistente à maioria dos antibióticos testados, para além de ser produtora de beta-lactamases e carbapenemos. Voltou-se a fazer novo TSA, mas desta vez usaram-se antibióticos que podem ser considerados de última linha e verificou-se resistência à maioria dos antibióticos. Os únicos antibióticos testados e aos quais esta estirpe foi sensível foram a Fosfomicina e a Polimixina B/Colistina, sendo este último um dos antibióticos de última linha utilizado em bactérias multirresistentes.

Este caso torna-se relevante pela necessidade que há na prevenção de resistências a antimicrobianos. É fundamental que o uso de antibióticos apenas seja feito quando necessário e que a sua utilização seja o mais correta possível, tanto na escolha do princípio ativo adequado, assim como, na dose e duração da terapêutica.

A necessidade de utilizar antibióticos de última linha é por si só arriscado, já que, pode induzir a novas resistências e de momento existe muito pouco desenvolvimento em novos antibióticos capazes de atuar em estirpes mais resistentes.

Sempre que o laboratório identifica uma bactéria produtora de carbapenemases, deve notificar imediatamente à Direção Geral da Saúde, assim como, enviar uma suspensão bacteriana da estirpe para o Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge (laboratório de referência).

Adotar medidas que promovam a prevenção e controlo de infeções é de extrema importância para evitar a disseminação de microrganismos resistentes.

6. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE DOENÇAS INFECIOSAS

Na prática laboratorial nem sempre é possível isolar e identificar o agente patogénico que está na origem da infeção (seja ele vírus, bactéria, fungo ou parasita), de modo que, as deteções de anticorpos específicos tendem a ser de maior utilidade clínica. Um indivíduo imunocompetente consegue responder à maioria das infeções ou imunizações através da produção de anticorpos específicos para os antígenos que pertencem e/ou são produzidos pelo agente patogénico. Estes anticorpos são encontrados na corrente sanguínea, embora também podem ser detetados noutros fluidos corporais. É na base desta especificidade que assenta a maioria das técnicas imunológicas para a deteção de antígenos e anticorpos.

Quando as proteínas do soro são separadas por eletroforese é possível identificar na região gama 5 classes de imunoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Em resposta a um processo infeccioso, basicamente IgM e IgG são as imunoglobulinas formadas [17]. Os anticorpos da classe IgM são os primeiros a aparecer no soro como resposta primária, 1 a 2 semanas após a manifestação da infeção e podem persistir até 3 meses, sendo indicadores de infeção ativa ou recente. A presença de títulos séricos de IgG surgem entre 2 a 3 semanas após a infeção e podem persistir com títulos detetáveis ao longo da vida, conferindo imunidade ao indivíduo [19].

Na rotina laboratorial é muito frequente o clínico solicitar a pesquisa de antígenos e/ou anticorpos para vários agentes patogénicos de forma a poder auxiliar no diagnóstico. O LSJ utiliza vários métodos para a pesquisa de marcadores serológicos consoante o agente em causa.

Geralmente estas pesquisas são feitas em amostras de soro, no entanto, existem determinações que podem ser feitas em plasma de heparina-lítio. Não obstante, é prudente saber se esta possibilidade vem referenciada na bula de modo a que o resultado não seja afetado.

6.1. VÍRUS

6.1.1 VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) pertence à família dos retrovírus. É um vírus muito variável e que sofre mutações com extrema facilidade. Existem dois tipos de vírus da imunodeficiência humana, o HIV-1 e o HIV-2, cuja estrutura e tropismo celular é semelhante.

O HIV-1 é o responsável pela infeção da maioria dos doentes em todo o mundo, podendo ser dividido em vários grupos e subtipos, consoante a sua variabilidade genética. O HIV-2

apresenta uma menor patogenicidade e tem uma distribuição geográfica mais restrita. Tanto o HIV-1 como o HIV-2 são transmitidos por via sexual, por introdução parentérica ou de mãe para filho.

O vírus do HIV é um vírus de RNA de dupla cadeia localizado no interior de uma cápside com morfologia cônica. Sua estrutura genética apresenta genes que codificam proteínas estruturais: *gag* (proteínas da cápside), *pol* (polimerase/transcriptase reversa) e *env* (proteínas do envelope). Outros genes adicionais regulam a síntese de outras proteínas virais [17].

O antígeno CD4 é o receptor do vírus e está presente essencialmente nos linfócitos T CD4⁺, mas também em monócitos e macrófagos.

Os sintomas da infecção primária surgem 2 a 4 semanas após o contágio, apresentando um quadro febril agudo, com dores musculares, linfadenopatias, faringite e exantema. Esta fase apresenta uma viremia elevada e extensa disseminação linfóide do vírus, acabando com uma depleção dos linfócitos T CD4⁺ e com uma resposta intensa e específica dos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos, que destrói as células infectadas mas não erradica o vírus. Poucas semanas após o quadro agudo, surgem anticorpos específicos para as proteínas do envelope (gp120 e gp41) e para a proteína da cápside (p24), também detectada na corrente sanguínea, sendo estes os alvos dos testes serológicos. A presença de antígeno p24 antes da seroconversão, permite a detecção precoce da infecção por HIV.

Segue-se a infecção crônica assintomática, que se apresenta com viremia menor que na fase inicial e uma diminuição lenta e gradual dos linfócitos T CD4⁺. A replicação do vírus permanece ativa no tecido linfóide apesar de existir anticorpos específicos contra o vírus e haver resposta por parte dos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos. Surgem sintomas constitucionais inespecíficos como febre, sudoração noturna, perda de peso, fraqueza. Algumas infecções oportunistas também podem surgir, afetando principalmente pele e mucosas.

A última fase da infecção designada por Síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) resulta numa diminuição drástica de linfócitos T CD4⁺ (< 200 linfócitos/ μ L) e um aumento da viremia. Há uma progressiva destruição do sistema imune, surgindo neoplasias atípicas e infecções maioritariamente oportunistas [10].

No LSJ é realizado no equipamento ARCHITECT, no módulo de imunologia (i2000SR), por imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA) a detecção qualitativa e simultânea do antígeno p24 e de anticorpos para o HIV-1/ HIV-2.

O ensaio por quimioluminescência tem duas fases (Figura 17). Numa primeira fase a amostra é combinada com um tampão, um diluente da amostra e micropartículas paramagnéticas.

Estas micropartículas estão revestidas com anticorpos monoclonais contra o p24 e antígenos HIV-1/HIV-2 aos quais se vão ligar o antígeno p24 e os anticorpos anti-HIV-1/anti-HIV-2 presentes na amostra. Após lavagem para retirar o excesso, o antígeno p24 e anticorpos anti-HIV-1/anti-HIV-2 ligam-se a um conjugado marcado com acridina (anticorpo monoclonal p24 para HIV e antígenos HIV 1 e HIV-2 recombinantes, respectivamente) e após outro ciclo de lavagem é adicionada uma solução ativadora à mistura de reação. A reação é medida por um sensor ótico e traduzido em unidades relativas de luz (RLUs). A relação entre as RLUs e a quantidade de antígeno p24 e anticorpos anti-HIV-1/anti-HIV-2 é diretamente proporcional. A presença ou ausência de antígeno p24 e/ou anticorpos anti-HIV-1/anti-HIV-2 na amostra é determinada por comparação entre o sinal quimioluminescente da amostra e o sinal obtido a partir da calibração do ensaio [20]. Todas as amostras inicialmente reativas ou com resultados próximos do *cut-off* tem de ser analisadas novamente em duplicado. Caso continuem a ser reativas deverão ser confirmadas por testes confirmatórios – imunoblot (Western blot).

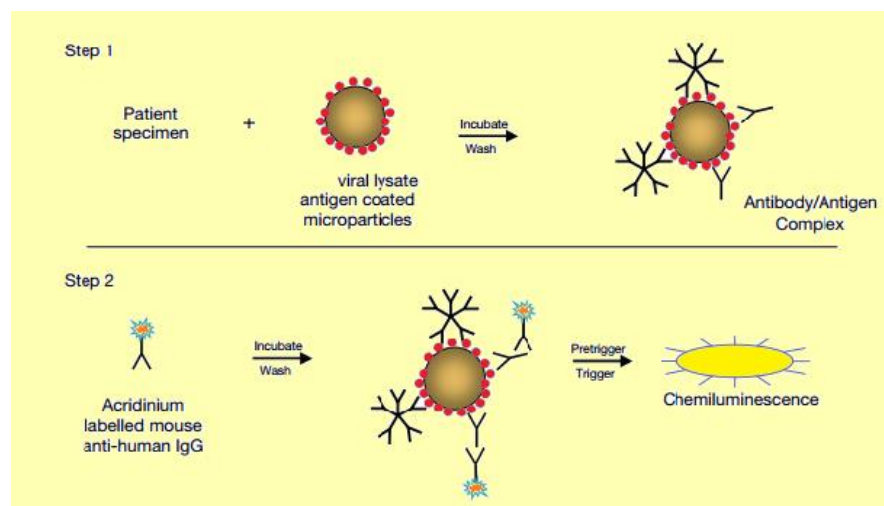


Figura 17: Esquema do imunoenensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA) ¹⁶.

O imunoblot permite detetar a presença de um ou mais anticorpos em simultâneo. Estes anticorpos vão reagir com diferentes proteínas que foram separadas por peso molecular e posteriormente imobilizadas numa membrana de nitrocelulose.

Os imunoblots para HIV vão conter as proteínas do vírus. Se amostra do paciente tiver anticorpos para estas proteínas, então estes vão-se ligar às respetivas, sendo esta ligação revelada pela adição de um conjugado (anticorpo que funciona como anticorpo secundário e está ligado a uma enzima, geralmente peroxidase) que se liga aos anticorpos do paciente (anticorpos primários) retidos na tira. Após incubação é removido o conjugado em excesso

¹⁶ Adaptado de: http://www.gfmer.ch/Membres_GFMER/pdf/Maine_2008.pdf

e é adicionado um substrato da enzima (geralmente, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, vulgarmente conhecido por TMB), aparecendo bandas escuras na tira de nitrocelulose. Esta reação pode ser parada a partir de uma solução stop, que nalguns casos é água. A leitura é feita através de uma tira controlo. Consoante a presença de determinadas bandas e seguindo determinados critérios é possível fazer a distinção entre infeção por HIV-1 ou HIV-2 [10].

6.1.2 HEPATITES VIRAIS

A hepatite é uma inflamação generalizada do fígado que pode ter várias etiologias: tóxica, auto-imune, genética e infecciosa.

A hepatite viral é induzida por vírus hepatotrópicos específicos. Existem para já cinco tipos de vírus da hepatite identificados e classificados de A a E [17].

A via de transmissão varia consoante o tipo de vírus. O vírus da hepatite A e vírus da hepatite E são transmitidos essencialmente por via fecal-oral a partir da ingestão de água ou alimentos contaminados por material fecal ou pelo contacto próximo com pessoas infetadas. Os restantes vírus, B, C e D são transmitidos por via sexual, via perinatal ou por via percutânea.

Os sintomas clínicos da hepatite provocados por estes vírus são análogos, embora variem na gravidade, duração e progressão para doença hepática crónica.

Geralmente estas infeções são acompanhadas por dor abdominal, fadiga, icterícia, elevação das transaminases, urina escura e fezes descoradas, entre outras.

Para além destes vírus, existem outros vírus e bactérias que podem dar origem a esta patologia.

O diagnóstico laboratorial das hepatites A, B, C, D e E consiste na deteção de antígenos presentes nas partículas virais e/ou anticorpos específicos no plasma/soro do paciente.

Na hepatite A, os anticorpos anti-HAV IgM são os primeiros a ser produzidos na fase inicial da infeção e surgem em simultâneo com os primeiros sintomas da doença. Estes anticorpos são de extrema utilidade para o diagnóstico de infeção em curso ou recente e tendem a desaparecer ao fim de 3 a 6 meses. A seguir aos anti-HAV IgM surgem lentamente os anti-HAV IgG que persistem ao longo da vida e conferem imunidade ao indivíduo. Após vacinação também é possível detetar anti-HAV IgG. Normalmente a hepatite provocada por HAV não evolui para a cronicidade [13].

A infeção pelo vírus da hepatite B (HBV) pode ter uma evolução distinta nos diferentes indivíduos. Na maioria dos casos a infeção aguda é resolvida, mas também pode dar-se o caso de a infeção evoluir para uma hepatite crónica. Apesar de ser muito raro, existem situações em que a hepatite aguda evolui para fulminante.

Os marcadores serológicos que permitem diagnosticar a hepatite por HBV surgem na corrente sanguínea em períodos distintos, permitindo assim monitorizar o curso da infeção. O primeiro marcador a surgir é o antigénio de superfície (HBsAg) que surge 1 a 10 semanas após exposição aguda. Em doentes que resolvem a infeção este antigénio torna-se indetetável após 4 a 6 meses. Se a sua presença for persistente por mais de 6 meses estaremos perante uma hepatite crónica. Logo, a sua pesquisa é primordial para o diagnóstico de hepatite B aguda recente ou identificação de portador crónico do vírus da hepatite B. Após várias semanas do desaparecimento do HBsAg surge o anticorpo contra o antigénio de superfície, o anti-HBs. Este facto cria um período de janela onde tanto o HBsAg como o anti-HBs são negativos. A presença de anti-HBs é indicativa de resolução da infeção e confere imunidade ao indivíduo. Esta imunidade também pode ser conseguida após vacinação contra o VHB. Apesar de não ser comum, pode-se dar o caso de existir coexistência de HBsAg/anti-HBs, nestas situações, os anticorpos não conseguem neutralizar o vírus, e os indivíduos são considerados portadores.

O anticorpo contra a cápside do HBV, o anti-HBc surge pouco tempo após o início da sintomatologia da hepatite. Inicialmente é constituído por anticorpos da classe IgM. Este anticorpo é muito útil para diagnóstico, já que, está presente no período que existe entre o desaparecimento do HBsAg e o surgimento de anti-HBs. Quando há resolução da infeção, o título de anti-HBc IgM diminui e o título de anti-HBc IgG começa a surgir. Normalmente os testes comerciais detetam anti-HBc total (IgM e IgG) e anti-HBc IgM. A presença de anti-HBc pode ser o único marcador serológico existente anos após infeção com HBV, mas tal não significa imunidade ao vírus.

A presença de antigénio HBe (HBeAg) é um marcador de replicação viral do HBV. É nesta fase que o período de contágio é mais elevado. A seroconversão de HBeAg para anti-HBe é precoce e ocorre antes da seroconversão do HBsAg para anti-HBs. A persistência de HBeAg está associada à cronicidade da infeção [17].

A infeção pelo vírus da hepatite C (VHC) origina uma hepatite aguda, normalmente assintomática e que na maioria dos casos cursa para a cronicidade. Esta cronicidade progride lentamente para cirrose e nalguns casos está na origem do carcinoma hepatocelular. A

presença de anticorpos anti-HCV indica que o indivíduo foi infetado com VHC e ser capaz de transmitir o vírus. Logo, não é sinónimo de imunidade protetora, já que a reinfeção com outro genótipo do vírus é possível [17].

No LSJ os testes para diagnóstico das hepatites virais são realizados no módulo de imunologia do equipamento ARCHITECT e baseiam-se em imunoenaios de micropartículas por quimioluminescência (CMIA). Para a hepatite A são pesquisados os anticorpos anti-HAV IgM e anti-HAV IgG, respetivamente. No diagnóstico de hepatite B é possível pesquisar o HBsAg e o HbeAg, assim como os anticorpos anti-HBs, anti-Hbe e o anti-HBc (total) e o anti-HBc IgM. Finalmente, para a hepatite C determina-se a presença de anticorpos anti-HCV (inclui IgM e IgG).

6.1.3 CITOMEGALOVÍRUS

O CMV é um membro da família *Herpesviridae*. Este vírus penetra através das mucosas pelo contacto com urina, saliva, secreções orofaríngeas, secreções endocervicais, esperma, leite materno, lágrimas ou por via hematogena, pela transfusão de produtos sanguíneos ou transplantação de órgãos. As principais células infectadas são os leucócitos e as células endoteliais. Como todos os vírus desta família, o CMV permanece latente no organismo do indivíduo após a primo-infeção, sofrendo periodicamente reativações [17]. O indivíduo seropositivo pode igualmente ser infetado por uma nova estirpe, pelo que a imunidade não lhe confere proteção.

A infeção num hospedeiro imunocompetente normalmente cursa de forma assintomática ou benigna. As infeções graves surgem normalmente nos recém-nascido ou nos hospedeiros imunocomprometidos.

O diagnóstico do CMV em grávidas é de extrema importância, já que é uma das principais causas de malformação congénita, atraso psicomotor e surdez do recém-nascido. A pesquisa de anticorpos anti-CMV IgM e anti-CMV IgG são as pesquisas de primeira linha. Para constatar que estamos perante uma primo-infeção é possível avaliar com a técnica de avidéz das IgG. A avidéz permite distinguir se estamos perante uma infeção primária ou não [21] (Figura 18) e (Tabela 16).

Tabela 16: Interpretação dos resultados serológicos do CMV.

IgM	IgG	Avidez	Diagnóstico
Negativo	Negativo		Não imune. Risco de infecção
Positivo	Positivo	Baixa	Possível infecção aguda
Positivo	Positivo	Alta	Reativação/ Infecção passada
Negativo	Positivo	Alta	Infecção passada

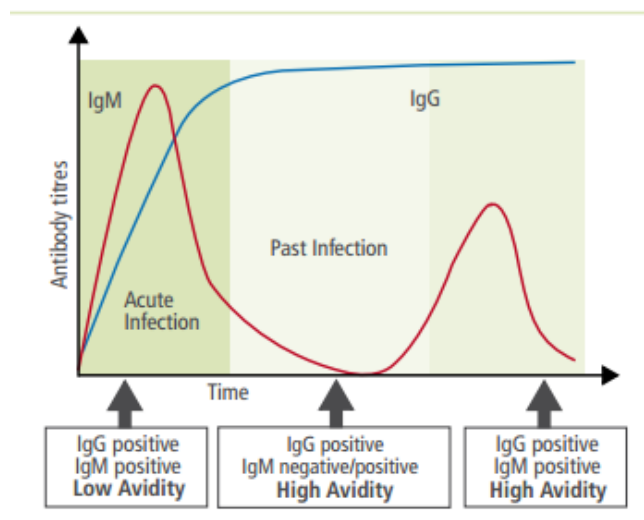


Figura 18: Seroconversão associada à infecção por CMV¹⁷.

No LSJ são pesquisados no equipamento ARCHITECT os anticorpos anti-CMV das classes IgM e IgG, assim como a avidéz dos anti-CMV IgG, pelo método de CMIA.

6.1.4 EPSTEIN-BARR

Assim como o CMV o EBV também pertence à família *Herpesviridae*. A sua transmissão ocorre a partir das secreções da orofaringe, embora também possa ocorrer, mas em menor proporção a partir de transfusões sanguíneas ou transplantes de medula óssea ou órgãos sólidos [17]. É o responsável pela maior parte dos casos de mononucleose infecciosa, embora também possa estar associado com o linfoma de Burkitt e com o carcinoma nasofaríngeo. Este vírus infecta células do epitélio da orofaringe e linfócitos B.

No LSJ são feitas as determinações dos anticorpos específicos anti-cápside de EBV, EBV VCA IgM e IgG, respetivamente, e os anticorpos anti-antígeno nuclear de EBV da classe IgG (EBNA 1– IgG). Estas determinações são feitas no equipamento automático ARCHITEC, pelo método CMIA.

¹⁷ Adaptado: http://www.diasorin.com/sites/default/files/allegati_prodotti/ese_schede_torch_unite.pdf

Os anticorpos VCA IgM e IgG estão presentes na fase aguda da doença, permanecendo estes últimos ao longo da vida. Os anticorpos IgG para o antígeno nuclear de EBV aumentam tardiamente na infecção e persistem ao longo da vida.

6.1.5 RUBÉOLA

A rubéola é uma doença transmitida por via aérea e altamente contagiosa, afetando essencialmente crianças e jovens adultos. É caracterizada pelo aparecimento de exantema e linfadenopatias e o seu diagnóstico é de extrema importância na mulher grávida e no recém-nascido, já que, se for contraída nas primeiras semanas de gestação pode induzir anomalias no feto e até provocar aborto [10] [22].

No LSJ a pesquisa de anticorpos específicos das classes IgM e IgG contra a rubéola é realizada no equipamento ARCHITECT pelo método CMIA.

6.1.6 HERPES SIMPLEX 1 E 2

O HSV geralmente infecta a pele e as mucosas estabelecendo latência nos gânglios sensitivos neurotrópicos podendo reativar, originando infeções sintomáticas assim como assintomáticas, o que contribui para a transmissão do vírus. A transmissão faz-se por várias vias, consoante a espécie. O HSV-1 é transmitido facilmente por via oral, pelo contacto com as mucosas, enquanto a transmissão do HSV-2 é feita por via sexual. O risco de transmissão vertical acontece geralmente em gestantes que apresentem herpes genital na altura do parto.

As manifestações clínicas variam consoante o local anatómico envolvido, a idade, sistema imunitário do hospedeiro e do tipo antigénico do vírus. A apresentação clínica mais comum é a presença de vesículas ulcerativas, embora outras complicações como queratite, gengivoestomatite, encefalite, entre outras, possam ocorrer [17].

A pesquisa de anticorpos específicos IgM e IgG contra os tipos 1 e 2 do HSV ajudam no diagnóstico em associação com a observação clínica das lesões. A pesquisa destes anticorpos no LSJ é feita por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).

Esta técnica utiliza as propriedades catalíticas das enzimas para detetar e quantificar reações imunológicas. Um dos componentes (antígeno ou anticorpo) da reação está aderido a uma fase sólida, uma placa poliestireno com 96 poços de microtitulação. As amostras de soro dos doentes, assim como os calibradores (quando existem) e os controlos são adicionados nos poços da placa e incubados durante um período de tempo definido pelo fabricante. Se existir na amostra do paciente o antígeno/anticorpo-alvo que estamos a pesquisar, este une-se aos

componentes aderidos nos poços. De seguida é removido o excesso através dum processo de lavagem e é adicionado um conjugado que consiste num anticorpo específico (para o antigénio ou anticorpo que pretendemos determinar) associado a uma enzima (normalmente uma peroxidase) que se vai ligar aos complexos antigénio-anticorpo pré-formados. Após nova incubação é removido o excesso por meio de lavagem e adiciona-se o substrato enzimático (o 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine). Aguarda-se o tempo necessário para que ocorra a reação de conversão do substrato em produtos e adiciona-se a solução de paragem que termina a reação. Segue-se a leitura da absorvância. A absorvância é lida a 450 nm utilizando um espectrofotómetro onde a quantidade de produto formado é proporcional à quantidade de antigénio ou anticorpo que estávamos a pesquisar [16].

Existem kits que possuem um conjunto de calibradores com concentrações várias e cujos valores de absorvância permitem a obtenção de uma curva-padrão, daí ser possível avaliar quantitativamente as amostras analisadas. Esta curva é estabelecida sempre que é aberto um novo kit. Após a obtenção da curva, nos ensaios posteriores apenas será necessário utilizar os controlos, cujas concentrações estão definidas, para deste modo poder controlar a técnica e validar os nossos resultados com confiança.

No entanto, existem ensaios que não utilizam curvas de calibração, mas avaliam os resultados consoante os valores de *cut-off*. Estes ensaios apenas nos permitem obter resultados qualitativos.

É de extrema importância que o processo de lavagem neste tipo de ensaios seja bem executado, já que, lavagens realizadas de maneira errónea podem comprometer os nossos resultados.

6.2. PARASITAS

6.2.1 TOXOPLASMOSE

O *Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular obrigatório. O seu ciclo de vida inclui uma fase sexuada que ocorre nos hospedeiros definitivos (gatos e outros felídeos) e uma fase assexuada nos hospedeiros intermediários (aves e mamíferos). A transmissão ao Homem pode ser feita por via oral-fecal (ooquistos) ou por via transplacentar (taquizoítos).

A infeção nos indivíduos imunocompetentes costuma ser assintomática e autolimitada, a grande preocupação prende-se com a infeção nos indivíduos imunodeprimidos e mulheres grávidas [17].

A infecção congênita ocorre quando a mãe sofre primo-infecção durante a gravidez. As complicações são tanto mais graves, quanto menor for o tempo gestacional e podem resultar em alterações neurológicas e alterações oculares.

A imunidade adquirida permanece para o resto da vida, logo, infecções passadas ou em curso são possíveis de diagnosticar por serologia.

No LSJ é feita a pesquisa de anticorpos específicos IgG e IgM, assim como a avidéz da IgG no equipamento ARCHITECT, pelo método CMIA.

6.3. BACTÉRIAS

6.3.1 SÍFILIS

A bactéria *Treponema pallidum* é o agente etiológico da sífilis. Pode ser transmitida por via sexual a partir de exsudatos infecciosos ou por via vertical, de mãe para filho [10].

Esta infecção quando não tratada evolui para a cronicidade apresentando períodos ativos caracterizados por algumas sintomatologias, assim como, períodos latentes e assintomáticos. As manifestações clínicas mais comuns incluem úlcera indolor, que geralmente aparece na região genital, lesões da pele e linfadenopatias, até situações mais graves, como lesões ao nível neurológico e cardiovascular. A infecção fetal pode provocar alterações cutâneas e das mucosas, lesões ósseas, meningite e até mesmo originar o aborto espontâneo.

Na prática laboratorial existem dois tipos de testes serológicos utilizados no diagnóstico: testes não treponémicos (inespecíficos) e testes treponémicos (específicos).

Os testes não treponémicos detetam anticorpos não treponémicos, ou seja, são anticorpos dirigidos contra antígenos lipídicos (cardiolipinas, lecitina e colesterol) das classes IgM e IgG produzidos na sequência da infecção por *Treponema pallidum*. Estes testes podem ser o VDRL (*venereal disease research laboratory*) e o RPR (*rapid plasma reagin*). Os testes positivos são apresentados como um título de anticorpos e servem para acompanhar a resposta eficaz da terapêutica. Estes testes tem a desvantagem de poderem dar reações falso-positivas, já que, os anticorpos não treponémicos ao não serem específicos da infecção por *Treponema pallidum*, podem surgir no decorrer de outras patologias ou situações fisiológicas, como sendo doenças autoimunes, hepatites virais, vacinação ou gravidez, entre outras. Sempre que se verifique um resultado positivo, este deve ser confirmado por um teste específico ou treponémico [17].

Os testes treponémicos como o próprio nome indica, pesquisam anticorpos específicos contra antígenos do *Treponema pallidum* e servem como confirmatório dos testes não

treponémicos. Os testes mais utilizados são o TPHA (*Treponema pallidum hemagglutination*), imunofluorescência indireta (IFI) e imunoenaios (CMIA, ELISA, entre outros). A vantagem da IFI e dos imunoenaios é que permitem uma deteção dos anticorpos das classes IgM e IgG, que são de grande utilidade no diagnóstico da sífilis recente e congénita. No TPHA eritrócitos de aves sensibilizados com componentes antigénicos de *Treponema pallidum* tendem a aglutinar quando reagem com anticorpos contra esses antígenos presentes no soro de doentes com suspeita de sífilis [16].

No LSJ são feitos testes não treponémicos de VDRL, RPR, assim como, pesquisa de anticorpos específicos (IgG e IgM) no equipamento ARCHITECT, pelo método CMIA, e pelo TPHA.

6.3.2 *Chlamydia trachomatis*

A *Chlamydia trachomatis* é uma bactéria intracelular obrigatória, sendo uma das causas mais comuns de infeções bacterianas sexualmente transmissíveis, a clamidiose genital. Normalmente, a infeção por *Chlamydia trachomatis* é assintomática. Algumas das manifestações clínicas comuns são disúria, piúria e exsudato purulento. A infeção neonatal na altura do parto pode provocar no recém-nascido conjuntivite ou pneumonia.

Esta bactéria sendo intracelular, não cresce nos meios tradicionais, sendo necessário o seu cultivo num meio com células suscetíveis à infeção, sendo observada a sua presença por imunofluorescência indireta [16].

A deteção de *Chlamydia trachomatis* no LSJ é feita pela determinação de anticorpos IgG e IgM por ELISA.

6.3.3 *Brucella*

A brucelose é uma infeção causada por bacilos Gram negativos do género *Brucella*. Estes microrganismos apresentam um crescimento lento e exigente, sendo transmitidos pela ingestão de leite e seus derivados ou por contacto da pele e mucosas com órgãos e materiais infetados de animais contaminados. A apresentação clínica pode ir desde bacteremia, infeções ósseas e articulares, infeções gastrointestinais e hepáticas, pneumonia e infeções do SNC.

O exame serológico é o método mais frequentemente utilizado para o diagnóstico de doentes com suspeita de brucelose.

No LSJ o teste realizado é o Rosa de Bengala. Este teste é um teste de aglutinação que permite uma triagem rápida. Consiste em colocar a amostra de soro do paciente em contacto com o antígeno Rosa de Bengala (suspensão de *Brucella abortus* em meio

tamponado e corado pela Rosa de Bengala). Caso a amostra apresente anticorpos específicos para a brucelose, desenvolve aglutinação visível a olho nu e com intensidade variável [12].

É importante ter em atenção o efeito prozona, onde títulos elevados de anticorpos induzem a um resultado falso-negativo. Quando as amostras são diluídas este efeito é minimizado e o resultado é positivo.

6.3.4 *Salmonella*

A pesquisa de anticorpos contra as salmonelas contribui para o diagnóstico da febre tifoide. Esta patologia está associada aos serotipos *S. typhi* e *S. paratyphi*.

Quando estas bactérias são ingeridas, passam para os gânglios linfáticos através do intestino delgado, onde se multiplicam, seguindo para o sangue que as transporta para vários órgãos, incluindo fígado, baço, medula óssea e intestino, sendo excretadas nas fezes [16].

O teste Widal-Félix é realizado no LSJ quando sugerido pelo clínico e é útil quando as hemoculturas e as coproculturas se mantêm negativas. Consiste em colocar diluições seriadas do paciente na presença de antígenos somáticos (O), e antígenos flagelares (H) para os serotipos *S. typhi* e *S. paratyphi* (geralmente A e B). Estes antígenos foram obtidos a partir de suspensão de bactérias, que foram inativadas. O antígeno na suspensão vai aglutinar na presença do anticorpo específico [12].

Uma elevação paralela do título (normalmente $> 1/80$) dos dois anticorpos, o flagelar e o somático, é indicativo de infeção.

É importante referir que este teste pode dar falsos-negativos se for realizado muito precocemente, antes do paciente produzir anticorpos, ou em casos onde o tratamento muito precoce deprimiu a resposta imunitária. Falsos-positivos também são possíveis em situações de reações cruzadas com outras espécies ou em caso de vacinação.

6.4. CASO CLÍNICO

A serologia infecciosa permite estabelecer um diagnóstico laboratorial a partir da pesquisa de anticorpos contra determinado agente infeccioso. Para ilustrar um pouco melhor a forma como é feito o diagnóstico, escolhi um caso onde são utilizados dois tipos de testes diferentes para a deteção de anticorpos contra o mesmo agente infeccioso.

6.4.1 CASO CLÍNICO VI

Utente de 36 anos, sexo masculino, com indicação de uso de drogas de abuso, dirigiu-se ao laboratório para realizar a determinação de antígeno/anticorpos contra a hepatite B, anticorpos contra a hepatite C e antígeno/anticorpos contra o VIH. Os resultados estão apresentados na **Tabela 17** e **Tabela 18**.

Tabela 17: Valores correspondentes ao caso clínico VI (A).

Parâmetro		Resultado	Unidades	Intervalo de referência
HBV	AgHBs	1912,5	IU/mL	Não reativo: < 0,05 Reativo ≥ 0,05
	AcHBs	0,0	mUI/mL	Não reactivo: <10,00 Reativo ≥ 10,00
	AcHBc total	12,0	S/CO (sample RLU/cut-off RLU)	Não reativo: <1,00 Reativo ≥ 1,00
HCV	Anti-HCV	12,2	S/CO	Não reativo: <1,00 Reativo ≥ 1,00
HIV	Ag/Ac HIV 1/2	769,1	S/CO	Não reativo: <1,00 Reativo ≥ 1,00

Este utente também fez a determinação de marcadores da função hepática, nomeadamente a GGT: 23 U/L (12-64) e as transaminases ALT: 12 U/L (<55) e AST: 20 (5-34), estando todas dentro do intervalo de referência.

Sendo a amostra reativa para o Ag/Ac HIV 1/2, realizamos o teste confirmatório, o Western blot, de forma a identificar anticorpos específicos contra diferentes proteínas virais. Conforme a presença de determinados anticorpos e seguindo alguns critérios de interpretação, podemos identificar se se trata dum HIV-1 ou um HIV-2. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 18**.

Tabela 18: Valores correspondentes ao caso clínico VI (B).

Anticorpos reativos para proteínas virais		Interpretação
gag	p17	Positivo para HIV-1
	p24	
pol	p51	
	p31	
env	gp41	
	gp120	
	gp36	
	gp105	

A pesquisa de anticorpos a partir do Western blot apresentou anticorpos específicos para proteínas virais do HIV-1.

Como se pode observar pelas pesquisas de antígenos e anticorpos, este indivíduo também está co-infetado com HCV e HBV. Seria interessante que o clínico solicitasse a pesquisa de anticorpos anti-HBc IgM, anticorpos anti-HBe e antígeno HBe, que permitissem confirmar que estamos perante uma infecção aguda ou crónica por HBV.

7. SECTOR BIOQUÍMICA CLÍNICA

O sector da bioquímica clínica é bastante abrangente, uma vez que, permite avaliar processos metabólicos e estados patológicos através da quantificação de um grande número de substâncias. Alterações nas concentrações dessas substâncias são de grande interesse clínico, tanto ao nível do diagnóstico, como na monitorização de terapêuticas.

No LSJ o tipo de amostra mais utilizado na Bioquímica é a amostra de soro, embora amostras de sangue total colhido em tubo com EDTA-K₃, amostras de plasma (colhidas em tubo com heparina-lítio ou citrato de sódio), assim como urina e outros fluídos biológicos, também possam ser utilizados. É fundamental que para cada parâmetro avaliado seja utilizado o tipo de amostra analítica correta, já que, o desempenho de todos os reagentes é avaliado pelas casas comerciais que os fornecem para determinados tipos de amostra. Caso não sejam respeitados os tipos de amostra com as quais foram estudados os desempenhos dos *kits*, podemos correr o risco de interferências que possam alterar os resultados obtidos.

A determinação da maioria dos parâmetros bioquímicos no LSJ é realizada no autoanalisador ARCHITECT (módulo *c8000*, *i2000SR* ou *i1000SR*). É também utilizado o equipamento Sebia Hydrasis para traçar o perfil eletroforético das proteínas séricas, separando-as nas suas várias frações.

Com exceção do sangue total colhido com EDTA-K₃ e utilizado na monitorização da HbA_{1c}, todas as amostras deverão ser centrifugadas de forma a obter amostras límpidas. É necessário ter espírito crítico quando verificamos que a amostra apresenta determinado grau de hemólise, lipémia e/ou icterícia, já que, estes fatores podem influenciar o resultado das determinações.

No sector de Bioquímica clínica do LSJ os parâmetros mais solicitados são determinados por métodos espectrofotométricos, turbidimétricos ou potenciométricos. No método espectrofotométrico recorre-se às propriedades das soluções que ao absorverem determinados comprimentos de onda permitem quantificar reações bioquímicas a partir dos substratos consumidos ou dos produtos formados. Ao fazer-se incidir luz com determinado comprimento de onda na solução, a concentração do analito que estamos a quantificar é proporcional à medida da radiação absorvida. O método turbidimétrico é um método de precipitação em fase líquida, isto é, deixa-se reagir a amostra contendo o analito que estamos a quantificar, que funciona como antigénio, com um anti-soro que contém o respetivo anticorpo. Esta ligação antigénio-anticorpo forma imunocomplexos insolúveis que interferem com a passagem do feixe de luz. Quanto maior a concentração do analito, menor

será a luz que atravessa a solução. Finalmente, o método potenciométrico mede as propriedades elétricas duma dada solução contendo eletrólitos (sódio, potássio e cloreto), através da diferença de potencial gerada entre dois elétrodos [13].

Alguns dos parâmetros mais frequentemente solicitados estão apresentados na **Tabela 19**.

Tabela 19: Parâmetros determinados com mais frequência no sector de Bioquímica clínica.

Grupo	Parâmetros		
Marcadores bioquímicos	Ácido úrico; Bicarbonato; Lactato; Magnésio; Proteínas totais; Glicose; Amónia; Fósforo;	Creatinina; Cálcio; Albumina; TIBC (capacidade de ligação total do ferro); Triglicerídeos; Ureia; Colesterol total;	Colesterol HDL; Colesterol LDL; Ferro; Bilirrubina total e direta; Vitamina D; Vitamina B ₁₂ ; Homocisteína; Folato; Peptídeo natriurético tipo B (BNP)
Enzimas	Aspartato aminotransferase (AST/GOT); Lipase; Amilase; Fosfatase ácida;	Creatina cinase total (CK); Creatina cinase B (CK-MB); Fosfatase alcalina;	Lactato desidrogenase (LDH); Gamma-glutamil transferase (GGT); Alanina aminotransferase (ALT/GPT)
Proteínas específicas	α -1-Antitripsina; Apolipoproteína A; Apolipoproteína B; Lipoproteína a; Imunoglobulinas (A, M, G, E); Microalbumina; α -1-glicoproteína ácida;	Transferrina; Troponina I; β -2-microglobulina; Complemento C3 e C4; Ceruloplasmina; Fator reumatoide (FR); Ferritina;	Haptoglobina; Pré-albumina; Antiestreptolisina O (ASO); Proteína C Reativa; Cadeias kappa e lambda; Mioglobina; Hemoglobina glicada (HbA _{1c})
Eletrólitos	Sódio	Potássio	Cloreto
Monitorização de drogas	Valproato Fenobarbital	Vancomicina Fenitoína	Digoxina Carbamazepina

8. SECTOR IMUNOLOGIA

A área da imunologia visa quantificar elementos que envolvam a atividade do sistema imunológico quando confrontado com um componente estranho ao organismo, assim como, ser uma ferramenta essencial no diagnóstico e monitorização de distúrbios imunológicos, como se verifica nas doenças autoimunes, processos alérgicos e de hipersensibilidade. Esta área também permite avaliar defeitos dos componentes do sistema imune que originam imunodeficiências, assim como, monitorização de terapêuticas que envolvam imunossupressão.

Por vezes há desregulação no controlo da multiplicação celular. As células tumorais que se geram, podem produzir certas substâncias cujo aparecimento ou pronunciado aumento indicam a presença de tumor. Estas substâncias são os chamados marcadores tumorais e cujo doseamento permite uma monitorização no tratamento, assim como, avaliação da progressão da doença. O marcador tumoral ideal seria aquele que permitisse o diagnóstico, isto é, só surgir com o aparecimento do tumor, mas na prática isto não se observa, já que, é possível dosear estes marcadores em pessoas aparentemente saudáveis, podendo aumentar nalguns deles em situações fisiológicas ou em doenças que não são do foro oncológico [9].

O tipo de amostra utilizada no LSJ é preferencialmente soro, podendo eventualmente ser usado outro tipo de amostra, desde que seja referenciado na bula dos reagentes utilizados.

No sector da imunologia as determinações baseiam-se em reações antigénio-anticorpo, variando apenas o método de deteção. A serologia infecciosa e os vários métodos de deteção enquadrei-os na área da Microbiologia, no entanto, no LSJ também é possível fazer o estudo de doenças autoimunes a partir da determinação de anticorpos que afetam um órgão específico (produz ou apresenta determinado antigénio) e anticorpos que originam patologias sistémicas, afetando vários órgãos, como veremos na **Tabela 20**. Estas determinações podem ser feitas manualmente ou automaticamente, nos vários módulos do autoanalisador ARCHITECT.

Tabela 20: Determinações imunológicas mais frequentes (exclui serologia infecciosa).

	Quimioluminescência	ELISA
Anticorpos	Anti-peroxidase (anti-TPO) Anti-tiroglobulina (anti-TG); Anti-recetor TSH (TRABs); Anti-peptídeos citrulinados (anti-CCP); Fator reumatoide (FR)	Anti-células parietais (APCA); Anti-fator intrínseco; Anti-gliadina; Anti-transglutaminase; Anti-endomísio; Anti-actina (F-actina); Anti-ds DNA

Os marcadores tumorais solicitados com maior frequência estão apresentados na **Tabela 21** e são feitos no autoanalisador ARCHITECT.

Tabela 21: Marcadores tumorais solicitadas no LSJ [9].

Marcadores tumorais	Indicação mais frequente
α – Fetoproteína	Hepatocarcinoma
Antigénio prostático específico (PSA) livre e total	Cancro da próstata
CA 15.3	Cancro da mama
CA 125	Cancro do ovário, pulmão e mama
CA 19.9	Carcinomas do tracto digestivo: pâncreas, gástrico, colorrectal
CEA	Cancro colorrectal
SCC	Carcinoma das células escamosas
β -2-microglobulina	Mieloma múltiplo, Leucemia linfocítica crónica, Macroglobulinemia de Waldenström
HE-4	Cancro do ovário
CYFRA 21-I	Neoplasia pulmonar

A monitorização terapêutica de imunossupressores é feita para a Ciclosporina, Tacrolimus e Sirolimus no equipamento ARCHITECT (*i2000SR*) e o tipo de amostra utilizada é sangue total colhido com EDTA. O doseamento é feito pelo método de quimioluminescência.

A pesquisa de IgE específicas associadas a reações alérgicas é realizada no equipamento ImmunoCap pelo método de referência, o imunoensaio fluorezimático (FEIA). A deteção do imunocomplexo (antigénio-anticorpo) é conseguido pela adição de um conjugado (anticorpo anti-imunoglobulina humana) ligado a fluoróforo que emite fluorescência e é lido por um fluorímetro. Os calibradores usados para calibrar os ensaios apresentam concentrações conhecidas que emitem um determinado valor de fluorescência e vão gerar uma curva de calibração na qual irão ser extrapolados os valores das amostras [25]. A amostra analítica utilizada é soro.

9. SECTOR ENDOCRINOLOGIA

Na área da endocrinologia avalia-se os distúrbios do sistema endócrino. Este sistema é composto por uma série de glândulas que vão secretar hormonas diretamente para a corrente sanguínea, tendo cada hormona uma função específica e sendo a sua concentração enquadrada dentro de condições específicas.

O doseamento das hormonas no LSJ pode ser feito manualmente pelo método de radioimunoensaio (RIA) ou nos módulos *i2000SR/i1000SR* do autoanalisador ARCHITECT pelo método de quimioluminescência, que já foi abordado anteriormente. Utiliza preferencialmente como amostra analítica o soro, mas também pode utilizar plasma, caso a bula do reagente assim o especifique.

O método de radioimunoensaio baseia-se no princípio da ligação competitiva utilizando uma molécula análoga à que queremos quantificar. Esta molécula análoga está marcada com isótopos radioativos, iodo 125 (I^{125}) [13]. A radioatividade é medida num contador de radiação gama e será tanto menor, quanto maior for a concentração do analito que estamos a determinar.

Algumas das hormonas que podem ser determinadas no LSJ estão apresentadas na **Tabela 22**.

Tabela 22: Parâmetros da valência de Endocrinologia pedidos com maior frequência.

	Radioimunoensaio	Quimioluminescência	
Hormonas	Testosterona livre; 17-Hidroxiprogesterona; Delta-4-Androstenediona; Hormona adrenocorticotrópica (ACTH); Renina; Aldosterona	Prolactina; Hormona luteinizante (LH); Testosterona total; Estradiol; Dehidroepiandrostenediona sulfato (DHEA-S); Gonadotrofina coriónica humana total (hCG); Progesterona; Globulina transportadora de hormonas sexuais (SHBG);	Hormona estimuladora da tiroide (TSH); Peptídeo C; Insulina; Triiodotironina (T3) total e livre; Tiroxina (T4) total e livre; Paratormona (PTH); Cortisol; Hormona foliculo estimulante (FSH)

10. CONCLUSÃO

O culminar deste relatório é também o culminar deste meu percurso no Mestrado de Análises Clínicas.

Este Mestrado apresenta uma componente teórica e prática que considero bastante completas, permitindo-me colocar em prática conhecimentos que possuo, reavivar outros, mas essencialmente, adquirir novos conhecimentos.

Sempre tive a necessidade de aprender, ir mais além do esperado e embarcar em novos desafios. Sempre que me surgiu a oportunidade de mudar de área no decorrer do meu percurso profissional, assim o fiz, pois considero que conhecimento é a ferramenta que nos destaca da maioria e nos torna mais preparados para os desafios do dia-a-dia.

Ao nível do estágio curricular, apostei em sair da minha zona de conforto. Decidi conhecer uma realidade diferente à que estou habituada, optei por realizar o meu estágio num laboratório privado, diferente aos serviços de Patologia Clínica de Hospitais Centrais por onde passei e onde desenvolvo a minha atividade profissional. No Laboratório São José, o laboratório não está sectorizado, como acontece na maioria dos hospitais. Aposta-se na polivalência, o que obriga, positivamente ao meu ver, que conhecimentos de todas as valências estejam presentes. O facto de sectorizar serviços cria o inconveniente dos profissionais apenas estarem especializados numa valência específica, o que também é importante, mas acabam por “esquecer” um pouco os conhecimentos que possuem noutras áreas. É importante ter presente que todas as valências estão interligadas e que os dados obtidos numa bioquímica, fazem sentido com os dados obtidos na hematologia, por exemplo, e é esta interligação que ajuda no diagnóstico.

Trabalhar num serviço de urgência aumentou a minha necessidade de me sentir mais preparada ao nível de conhecimentos teóricos e práticos, já que, fora do horário de rotina, é preciso dar resposta a determinadas solicitações dos clínicos nas várias valências.

Sem dúvida que esta experiência ao nível académico, profissional e pessoal deixará a sua marca.

Novos desafios se avizinham, aguardo-os de braços abertos!

BIBLIOGRAFIA

- [1] BURMESTER, G.; PEZZUTTO, A. – Imunologia – Texto e atlas. 1ª Edição, Lidel - edições Técnicas, 2005, ISBN: 978-972-757-329-5. p: 2; 114.
- [2] BAIN, Barbara J. – Células sanguíneas: um guia prático. 5ª Edição, Artmed, 2016, ISBN: 978-85-8271-330-3. p: 5-15; 67-144; 232-258.
- [3] ABBOTT - CELL-DYN® 3700 Operator's Manual. 2007. [acedido 18 de julho de 2017]. Disponível na internet: <http://resources.psmile.org/resources/equipment/specific-equipment/abbott/cell-dyn/celldyn-3700-operators-manual>
- [4] SANTOS, V.M.; DA CUNHA, S.F.; DA CUNHA, D.F. - Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações. Revista da Associação Médica Brasileira. Volume 46, nº 3 (2000), p: 232-236. [acedido a 23 de julho de 2017]. Disponível na internet: <http://www.scielo.br/pdf/ramb/v46n3/3082.pdf>
- [5] SEBIA - HYDRAGEL 7 HEMOGLOBIN(E). 2012. [acedido a 1 de agosto de 2017]. Disponível na internet: [http://www.ilexmedical.com/files/Sebia%20inserts/HYDRAGEL_HEMOGLOBIN\(E\)_Hydrasis.pdf](http://www.ilexmedical.com/files/Sebia%20inserts/HYDRAGEL_HEMOGLOBIN(E)_Hydrasis.pdf)
- [6] SYSMEX - Operator's manual. Automated Blood Coagulation Analyzer CA-1500 (American Edition). 2009. [acedido a 20 de julho de 2017]. Disponível na internet: <https://photos.medwrench.com/equipmentManuals/5525-3272.pdf>
- [7] SYSMEX - SEED-África Boletim Informativo Nº 3. 2011. [acedido a 21 de julho de 2017]. Disponível na internet: https://www.sysmex.co.za/fileadmin/media/fl12/SEED/Portuguese/SYSMEX-SEED3_Teste_do_tempo_de_protrombina.pdf
- [8] BURTIS, C.A; ASHWOOD, E.R.; BRUNS, D.E. – Tietz, fundamentos de química clínica. 6ª Edição, Elsevier, 2008, ISBN: 978-85-352-2845-8. p: 523-529.
- [9] PÁDUA, Mário M – Patologia clínica para técnicos (Tomo II: Química Clínica). 1ª Edição, Lusociência, 2009, ISBN: 978-972-8930-50-9. p: 297-318.
- [10] WILLIAMSON, M.A; SNYDER, L.M. – Wallach: interpretação de exames laboratoriais. 9ª Edição, Guanabara Koogan, 2013, ISBN: 978-85-277-2230-8. p: 50-51; 139-140; 167; 302-312; 370-440; 840-898.
- [11] BRIDSON, E.Y. -The OXOID manual. 9th Edition, Oxoid Limited, 2006. [acedido a 4 de julho de 2017]. Disponível na internet: http://www.analisisavanzados.com/modules/mod_tecdata/manuales/oxoid-manual-9th-edition.pdf

- [12] CAQUET, René – Análises clínicas, guia prático de medicina. 1ª Edição, Climepsi Editores, 2004, ISBN: 978-972-796-024-8. p: 107; 199-201; 215- 216; 465.
- [13] XAVIER, R.M.; ALBUQUERQUE, G.C.; BARROS, E. – Laboratório na prática clínica: consulta rápida. Artmed, 2005, ISBN: 978-85-363-0352-9. p: 53-68; 263-272; 335-354; 388-391; 617-620; 630-635.
- [14] COLLEE, J.G; DUGUID, J.P; FRASER, A.G et al. – Microbiologia médica. 6ª edição, Fundação Calouste Gulbenkian, 1993. ISBN:972-31-0416-4. p: 211-246; 488; 593-617.
- [15] ABBOTT - CELL-DYN® 3700. [acedido 18 de julho de 2017]. Disponível na internet: http://www.nearmedic.ru/upload/files/Doc_389_578.pdf
- [16] BARROSO, H.; MELIÇO-SILVESTRE, A.; TAVEIRA, N. – Microbiologia médica 1. Lidel -edições técnicas, 2014, ISBN: 978-989-752-057-0. p: 161-181; 211-304; 316-403; 444-450; 488-494.
- [17] BARROSO, H.; MELIÇO-SILVESTRE, A.; TAVEIRA, N. – Microbiologia médica 2. Lidel -edições técnicas, 2014, ISBN: 978-972-757-576-3. p: 29-38; 68-88; 221-263; 309-338; 462-465.
- [18] VIDAL-CATHAIA, E.; TERLAUD, C. – Diagnóstico médico: guia prático de medicina. 1ª Edição, Climepsi editores, 2006, ISBN: 978-972-796-179-5. p: 37-40.
- [19] SACHER, R.A.; MCPHERSON, R.A. Widmann. Interpretação clínica dos exames laboratoriais. 11ª Edição, Manole, 2002, ISBN: 85-204-1231-9. p:236-282; 367-383; 631-638; 671-678; 700-716.
- [20] ABBOTT - ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo. 2009. [acedido a 11 de julho de 2017]. Disponível na internet: <http://www.illexmedical.com/files/PDF/HIVAgAbCombo.pdf>
- [21] ABBOTT - ARCHITECT CMV IgG Avidity. [acedido a 13 de julho de 2017]. Disponível na internet: http://www.illexmedical.com/files/PDF/CMVIgGAvidity_ARC.pdf
- [22] ABBOTT - ARCHITECT Rubella IgM [acedido a 13 de julho de 2017]. Disponível na internet: http://illexmedical.com/files/PDF/RubellaIgM_ARC.pdf
- [23] THERMO FISHER SCIENTIFIC. 2016 - 2017 Microbiology Products US Catalog. [acedido a 4 julho de 2017]. Disponível na internet: <http://remel.com/PDF/RemelCatalog.pdf>

- [24] GRABE M, et al. - Guidelines on Urological Infections. European Association of Urology. 2015. [acedido a 5 de julho de 2017]. Disponível na internet: https://uroweb.org/wp-content/uploads/19-Urological-infections_LR2.pdf
- [25] <http://www.phadia.com/pt-PT/5/Testes/Principio-de-Teste-IgA-Especifico-ImmunoCAP/> [acedido a 3 de agosto de 2017].

ANEXOS

ANEXO A. COLORAÇÃO DE GRAM

1. Adicionar Violeta de Genciana (1º corante) e esperar 2 minutos;
2. Lavar gentilmente com água destilada durante 2-3 segundos;
3. Adicionar soluto de Lugol (mordente) e esperar aproximadamente 30 segundos;
4. Lavar gentilmente com água destilada;
5. Adicionar álcool-acetona (diferenciador), mas evitar descorar em excesso;
6. Lavar gentilmente com água destilada e descartar o excesso;
7. Adicionar Fucsina de Ziehl diluída (2º corante) e aguardar 20 segundos;
8. Lavar com água destilada e secar.

ANEXO B. MÉTODO DE RITCHIE (PRINCÍPIO DE SEDIMENTAÇÃO)

1. Retirar com auxílio do coletor uma pequena amostra de fezes e colocar num tubo de fundo plano;
2. Adicionar formol (conservante) até meio do tubo;
3. Fechar o tubo e vortexar até dissolver as fezes;
4. Retirar a tampa do coletor e adicionar 1,25 mL de Acetato de Etílico;
5. Conectar o tubo de fundo plano a um tubo cônico contendo um filtro e inverter;
6. Misturar agitando entre 10 a 30 segundos;
7. Deixar que a suspensão seja filtrada;
8. Centrifugar o filtrado durante 5 a 10 minutos a 1500 – 2000g;
9. Retirar o filtro e rejeitar o sobrenadante;
10. Observar o sedimento ao microscópio, podendo usar soluto de Lugol para facilitar a observação.