



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Maria Miranda Forte

Relatório de Estágio
Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Doutora Sílvia Malheiro e pela Professora Doutora Armanda Santos e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho de 2019

Ana Maria Miranda Forte

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Doutora Sílvia Malheiro e pela Professora Doutora Armanda Santos e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Estágio realizado no Serviço de Patologia Clínica
Unidade Local de Saúde do Alto Minho (ULSAM) - Hospital Santa Luzia

Dezembro de 2018 a junho de 2019

Julho 2019



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Agradecimentos

Ao Doutor José Mota Freitas, Diretor do Serviço de Patologia Clínica da ULSAM por ter possibilitado a realização do estágio no serviço e por toda a atenção que teve.

À Doutora Sílvia Malheiro, minha orientadora externa, por tudo o que me ensinou, pela atenção que sempre teve, por se demonstrar totalmente disponível e pela revisão deste trabalho.

À Doutora Sandra Vieira, responsável pelo setor de Microbiologia, por me ter orientado nesta secção, pelos conhecimentos que me transmitiu, pelos desafios que propôs e pela sua revisão.

À Doutora Maria José Gaião, responsável pelo setor de Hematologia e às TSDT Bernardete Alves e Sofia Monteiro pelos ensinamentos e pelo apoio.

À TSDT Cristina Malta, pelo entusiasmo com que me explicava procedimentos e princípios e disponibilidade em ajudar e a todos os TSDT que desde o início me fizeram sentir integrada e esclareceram todas as minhas dúvidas.

À Professora Doutora Armanda Santos, minha orientadora interna, por ser sempre atenciosa e pela ajuda na elaboração do relatório.

À Professora Doutora Leonor Almeida, pela sua atenção e pela revisão do relatório.

À Professora Doutora Maria do Céu Sousa pelo apoio que sempre demonstrou ao longo do mestrado e pela sua dedicação.

À Professora Doutora Ana Miguel Sousa, coordenadora do Mestrado em Análises Clínicas, pelo trabalho que está a desenvolver.

Aos meus pais, pelo apoio ao longo de todos estes anos, por serem incansáveis e fazerem tudo por mim, por terem sempre as palavras certas e pela motivação que sempre me deram independentemente dos caminhos que escolhi.

Às minhas amigas de sempre, Adriana Vieira, Alexandra Meira e Marlene Castro, pelos momentos de desabafo e descontração. Um especial obrigado à Margarida Pereira, por toda a ajuda que prestou, desde a licenciatura até aqui.

À Inês Lages, a minha irmã de coração, pelas conversas que tanto me fazem bem.

Ao Henrique Silva por ser o meu pilar, por sempre me dar força e motivação.

Índice

Agradecimentos	iii
Índice.....	v
Índice de Anexos	vi
Abreviaturas.....	vii
Resumo.....	ix
Introdução	- 1 -
Caracterização do Laboratório de Análises Clínicas	- 2 -
HEMATOLOGIA	- 5 -
1. Hemograma.....	- 6 -
1.1. Parâmetros incluídos e princípio de funcionamento do autoanalisador.....	- 6 -
1.2. Interpretação do hemograma.....	- 9 -
1.3. Esfregaços de sangue periférico	- 17 -
2. Velocidade de Sedimentação Eritrocitária (VS).....	- 18 -
3. Curva de fragilidade osmótica.....	- 19 -
4. Hemoglobina Glicada	- 20 -
5. Frações de Hemoglobina.....	- 21 -
6. Análise de células de outros Fluidos Biológicos.....	- 21 -
6.1. Líquido Cefalorraquidiano (LCR)	- 22 -
6.2. Líquido Sinovial.....	- 23 -
6.3. Fluido Pleural e Fluido Peritoneal.....	- 24 -
7. Espermograma	- 25 -
MICROBIOLOGIA.....	- 28 -
1. Colheita e transporte das amostras	- 28 -
2. Exame bacteriológico.....	- 29 -
2.1. Exame bacteriológico em diferentes amostras biológicas.....	- 30 -
2.2. Identificação dos microrganismos e provas de suscetibilidade aos antibióticos....	- 43 -
3. Exame micobacteriológico.....	- 46 -
4. Exame micológico	- 48 -
4.1. Identificação de leveduras.....	- 49 -
5. Exame parasitológico	- 50 -
6. Exame virológico	- 50 -
IMUNOQUÍMICA	- 52 -
Conclusão	- 54 -
Bibliografia	- 55 -
Anexos.....	- 61 -

Índice de Anexos

Anexo 1 - Procedimentos para colheita e transporte de diferentes amostras.....	- 61 -
Anexo 2 - Meios de Cultura utilizados na seção de Microbiologia.....	- 63 -
Anexo 3 - BD Phoenix TM 100.....	- 66 -
Anexo 4 - Vitek 2 Compact.....	- 66 -
Anexo 5 - Teste da Catalase.....	- 66 -
Anexo 6 - PAXTOREX STAPH-PLUS.....	- 67 -
Anexo 7 - Técnica de Kirby-Bauer para realização do Antibiograma.....	- 67 -
Anexo 8 - Teste de susceptibilidade à optoquina.....	- 68 -
Anexo 9 - Teste citocromo c -oxidase (método de Kovac).....	- 68 -
Anexo 10 - Teste dos fatores V e/ou X.....	- 69 -
Anexo 11 - Método de N-acetil-L-cisteína com 2% hidróxido de sódio.....	- 69 -

Abreviaturas

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ACTH	Hormona adrenocorticotrófica
BARR	Bacilos ácido álcool resistentes
BEA	<i>Bile Esculin Agar</i>
BCYE	<i>Gelose Buffered Charcoal Yeast Extract</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BNP	Peptídeo natriurético, tipo B
CBC	<i>Complete blood count</i>
CLED	<i>Cystine Lactose Electrolyte Deficient</i>
CIN	Gelose Cefsulodina-Irgasan-Novobiocina
CQI	Controlo de Qualidade Interno
COS	Gelose Columbia com sangue de ovelha a 5%
CV	Coeficiente de Variação
DST	Doença sexualmente transmissível
FRI	Fração de reticulócitos Imaturos
FSC	<i>forward scatter</i>
HbA1c	Hemoglobina Glicada A _{1c}
HAECK	<i>Haemophilus aphrophilus, Actinobacillus actinomycetemcomitans, Cardiobacterium hominis, Eikenella corrodens e Kingella kingae</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
ITU	Infeção do Trato Urinário
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MCH	Hemoglobina Corpuscular Média
MCHC	Concentração Hemoglobina Corpuscular Média
MCK	Gelose <i>MacConkey</i>
MCV	Volume Corpuscular médio
MGIT	<i>Mycobacteria Growth Indicator Tube</i>
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
NALC-	N-acetil-L-cisteína com 2% hidróxido de sódio
NEQAS	<i>External Quality Assessment Services</i>
PCR	Proteína C-reativa
PLT-F	Plaquetas por fluorescência
PVX	Gelose Chocolate com mistura <i>PolyViteX</i>

RDW	<i>Red blood Cells Distribution Width</i>
RET	Reticulócitos
RIQAS	<i>Randox International Quality Assessment Scheme</i>
RPM	Rotações por minuto
RSV	<i>Respiratory syncytial virus</i>
SCG	Gelose <i>Saboraud-Cloranfenicol-Gentamicina</i>
SCS	Gelose <i>Schaedler</i> com 5% Sangue Ovelha
SD	Desvio Padrão (Standard deviation)
SFL	<i>side fluorescence</i>
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SLS	<i>Sodium lauryl sulfate</i>
SS	Gelose <i>Salmonella Shigella</i>
SSC	<i>side scatter</i>
TG	Caldo Tioglicolato
TSDT	Técnico Superior de Diagnóstico e Terapêutica
TSS	Técnico Superior de Saúde
ULSAM	Unidade local de Saúde do Alto Minho
VCAT	PVX (Vancomicina, Colistina, Anfotericina B, Trimetoprim)
VS	Velocidade de Sedimentação
WDF	<i>White blood cell differential</i>
WNR	<i>White cell nucleated</i>
WPC	<i>White progenitor cell</i>

Resumo

O estágio, inserido no Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, tem como objetivos principais a formação em contexto real de um Laboratório Clínico com a aplicação e a consolidação de conhecimentos adquiridos nas áreas curriculares.

O local escolhido para o desenvolvimento do estágio foi o Serviço de Patologia Clínica na Unidade Local de Saúde do Alto Minho (ULSAM)-Hospital Santa Luzia em Viana do Castelo, que decorreu num período de 6 meses, sendo este dividido entre Hematologia, Microbiologia e Imunoquímica. Este estágio permitiu-me integrar as equipas do trabalho diário, de rotina, tanto no processamento das amostras e controlos de qualidade interno, como também no acompanhamento e na validação de resultados e no Controlo de Qualidade Externo.

Deste modo, com a elaboração do relatório pretende-se descrever as atividades desenvolvidas e, concomitantemente, os conhecimentos teóricos subjacentes, dando mais enfoque às áreas de Hematologia e de Microbiologia.

Palavras-chave: Patologia Clínica, Hematologia, Microbiologia, Imunoquímica, diagnóstico laboratorial, ULSAM.

Abstract

The main goal of the curricular internship of the Master degree in Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy at the University of Coimbra, is to gain experience in a real work place in the scope of the main clinical laboratory areas, applying previous acquired knowledge and developing basic skills for working in a Clinical Laboratory.

The internship was accomplished at the Clinical Pathology Service of the “Unidade Local de Saúde do Alto Minho” (ULSAM) - Hospital Santa Luzia, along 6 months, and included mainly 3 laboratory services, namely Hematology, Microbiology and Immunobiochemistry. This internship allowed me to integrate in the laboratory routine daily work, both in the processing of samples and Internal Quality Control, as well as monitoring the validation of results and the External Quality Control.

Thus, in this report, the performed activities and concomitantly the underlying theoretical knowledge are described, giving a greater focus to the areas of Hematology and Microbiology.

Keywords: Clinical Pathology, Hematology, Microbiology, Imunochemistry, laboratorial diagnosis, ULSAM.

Introdução

A história das análises clínicas começou no início do século XIX devido não só ao interesse cada vez maior pelos fluídos biológicos e em perceber o estado de doença, como também à química das reações analíticas nesses fluídos. O seu maior desenvolvimento foi no início do século XX graças à aplicação de métodos com determinações mais precisas. Nos anos 60, houve uma maior utilização de técnicas químicas executadas maioritariamente ao sangue e urina que levaram a que a prática clínica fosse cada vez mais dependente das análises clínicas (Rosenfeld, 2002).

De facto, é inegável a relevância dos testes realizados num Laboratório Clínico, pois permitem muitas vezes a confirmação de uma suspeita clínica de um possível diagnóstico; auxílio na seleção, na otimização e na monitorização do tratamento; rastreio de uma doença na ausência de sinais ou sintomas clínicos, entre muitas outras funções (Bruns, Rousseau, Burtis, 2016). Neste sentido, é crucial que o Laboratório de Análises Clínicas possua recursos, nomeadamente instalações adequadas, equipamento e pessoal com conhecimentos médicos, científicos e técnicos capaz de utilizar corretamente os recursos supracitados (Carreiro-Lewandowski, 2010; Kurek, Lifshitz, 2012).

O Mestrado de Análises Clínicas proporciona um estágio de carácter profissional, em contexto de trabalho real num Laboratório Clínico, com a participação na rotina de trabalho. Este estágio permite a aplicação e consolidação dos conhecimentos adquiridos nas diversas unidades curriculares e a obtenção de competências científicas e técnicas de um Técnico Superior na área do diagnóstico laboratorial.

O local escolhido para o desenvolvimento do estágio foi o Serviço de Patologia Clínica na Unidade Local de Saúde do Alto Minho (ULSAM)-Hospital Santa Luzia em Viana do Castelo. Este Serviço, integrado no Departamento de Meios Complementares de Diagnóstico e Terapêutica está organizado em 3 secções distintas: Hematologia, Imunoquímica e Microbiologia. A nível laboratorial esta unidade de saúde conta ainda com o Laboratório de Imunohemoterapia e o Laboratório de Saúde Ambiental. O estágio decorreu num período de 6 meses sendo este dividido entre Hematologia, Microbiologia e Imunoquímica.

Assim, com a elaboração deste relatório pretende-se descrever as atividades desenvolvidas e concomitantemente os conhecimentos teóricos subjacentes, dando mais enfoque às áreas de Hematologia e Microbiologia.

Caracterização do Laboratório de Análises Clínicas

O serviço de Patologia Clínica integra o departamento de Meios Complementares de Diagnóstico e Terapêutica da Unidade Local de Saúde Alto Minho (ULSAM). A nível hospitalar, a ULSAM é constituída por dois polos, Hospital de Santa Luzia em Viana do Castelo e Hospital Conde de Bertiandos em Ponte de Lima, sendo constituído ainda por 12 Centros de Saúde, uma Unidade de Saúde Pública e duas Unidades de Convalescença prestando assim serviços em todo o distrito de Viana do Castelo.

A direção do Serviço de Patologia Clínica é assumida pelo Dr. Mota Freitas, médico patologista. Encontra-se em integração um novo médico patologista, o Dr. Yuriy Shevchenko. Como já foi referido, o serviço encontra-se subdividido na seção de Hematologia, sob responsabilidade clínica da Dr.^a Maria José Gaião; secção de Microbiologia da responsabilidade da Dr.^a Sandra Vieira e Imunoquímica da responsabilidade da Dr.^a Cristina Maldonado. O Laboratório de Saúde Ambiental, da responsabilidade da Dr.^a Ana Queirós, realiza análises química (acreditadas, em transição, pela NP EN ISO/IEC 17025:2018) e microbiológicas a águas destinadas a consumo e de piscinas e o Serviço de Imunohemoterapia, sob direção do Dr. Miguel Jorreto, serviço este que assegura a colheita, estudo, processamento e armazenamento das dádivas de sangue, assim como o diagnóstico e tratamento de coagulopatias, hipercoagulabilidade e trombofilia.

O laboratório, com o Sistema de Gestão de Qualidade (SGQ), certificado pela NP EN ISO 9001:2015, tem como função realizar as análises clínicas requisitadas pelos clínicos, apresentando resultados exatos e precisos em tempo oportuno e esclarecer o clínico quanto aos resultados obtidos. À margem do âmbito do SGQ, o laboratório participa ainda em Ensaios Clínicos a decorrer no Hospital (intermediados pela *BlueClinical*) prestando apoio laboratorial na preparação e envio de amostras para os Laboratórios envolvidos nos distintos ensaios clínicos.

Os clínicos requisitam as análises através do sistema de apoio ao Médico *SClínico*. É possível analisar diferentes tipos de amostras, sangue, urina, fezes, outros líquidos biológicos, sendo alguns mais ou menos invasivos. A flebotomia é a principal técnica de colheita e é realizada por enfermeiros quando inserida em contexto de internamento ou Unidade de Dia e por Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica na Central de Colheitas, quando solicitada em contexto de Consulta Externa. A fase pré-analítica envolve a fase pré-pré-analítica, na qual o clínico decide quais as análises a requisitar, sendo que este pedido pode ser apoiado pelo laboratório sempre que solicitado. Esta fase do processo inclui a seleção e identificação dos tubos/contentores de colheita, validação da identidade do utente, transporte

e preparação das amostras (centrifugação, preparação de alíquotas, entre outros). As etiquetas utilizadas para identificação das amostras comportam diferentes informações: nome completo do utente, idade e género, serviço requisitante, e número de tubo. A maioria dos erros ocorre nesta fase, por isso é importante ter consciência das suas principais fontes, no sentido de os minimizar (Neogi, *et al.*, 2016).

As amostras colhidas/recebidas na central de colheita chegam ao Serviço por intermédio de auxiliares que distribuem as amostras pelas distintas secções executantes. As amostras com origem no Internamento, Urgência e Hospital de Dia, são recebidas pelo secretariado que as distribui pelas secções. No momento de receção do produto o pedido do clínico é integrado no *Clinidata XXI*, sistema de Gestão Laboratorial. Este Sistema está ligado bidireccionalmente à maioria dos autoanalisadores (Tabela I), assim, estes recebem automaticamente os pedidos e após processamento das amostras enviam os resultados para o *Clinidata XXI*, onde se procede à validação dos resultados.

Tabela I - Equipamentos de Serviço de Patologia da ULSAM.

	Equipamento	Determinações
Hematologia	Sysmex XN-2000	Hemograma Fluídos biológicos
	VES-MATIC 30	Velocidade de Sedimentação
	ADAMS AIC HA-8160	Hemoglobina Glicada/ Frações hemoglobina
	GEM Premier 3500 e 4000	Gasometria/Ca ²⁺ ionizado/Co-oximetria
	Hematek Slide Stainer	Coloração de esfregaços sanguíneos
Microbiologia	PREVI Color Gram	Coloração Gram das amostras
	Bactec 9240	Incubação e leitura dos frascos de hemoculturas
	Bactec MGIT 960	Incubação e leitura dos frascos de cultura do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	GeneXpert IV	Deteção MRSA/KPC/Influenza A e B
	Phoenix 100	Identificação e antibiograma de microrganismos
Vitek 2 Compact	Identificação e antibiograma de microrganismos	
Imunoquímica	Genesis FE500 TECAN	Triagem, centrifugação e preparação de alíquotas
	Architect (c8000 + i2000)	Parâmetros de bioquímica, marcadores cardíacos, marcadores víricos, marcadores tumorais, endocrinologia
	Mago 4	Autoimunidade em lâmina/ serologia infecciosa
	Cobas e411	PAPP-A, β-HCG, ACTH, calcitonina, TSH
	ImmunoCAP 250	Alergologia/Autoimunidade
	MINICAP	Eletroforese das proteínas do soro e imunofixações
Combinado UC MAX e SediMAX	Urina tipo II e sedimento urinário	

Relativamente à fase pós-analítica, destacam-se o serviço de Consultoria ao clínico, a comunicação de resultados críticos, a vigilância epidemiológica, a participação em programas de Avaliação Externa da Qualidade e o acompanhamento de serviço realizado no exterior. O protocolo de comunicação de resultados críticos e/ou de emergência clínica é transversal ao Serviço, neste, o laboratório compromete-se a comunicar com a maior brevidade os resultados ao clínico. Os resultados que despoletam este protocolo devem ser contextualizados de acordo com a origem do utente: internamento, urgência, Hospital de dia ou Consulta externa e o seu histórico. A participação em programas de avaliação externa de qualidade - *Randox International Quality Assessment Scheme (RIQAS)* e *External Quality Assessment Services (NEQAS)* é um meio independente de garantia de qualidade dos resultados laboratoriais e permite ao serviço avaliar a precisão, a exatidão e a comparabilidade dos seus resultados com outros ao longo do tempo, identificar desempenho insatisfatório, detetar erros analíticos e, conseqüentemente, tomar ações corretivas assim como assegurar a confiança dos clientes, clínicos e utentes (Kristensen, Meijer, 2017).

HEMATOLOGIA

A Hematologia Clínica é a especialidade que estuda o sangue e os seus componentes, sobretudo as células sanguíneas (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) e os órgãos hematopoiéticos (medula óssea, baço e gânglios linfáticos) nas vertentes clínica e de laboratório. Esta, apoiada por análises laboratoriais, estuda várias doenças, nomeadamente anemias, leucemias, linfomas, e alterações da coagulação. (Vajpayee et al., 2012).

A equipa de trabalho da secção de Hematologia Laboratorial é composta por duas Técnicas Superiores de Saúde (TSS), Farmacêuticas Especialistas em Análises Clínicas e duas Técnicas Superiores de Diagnóstico e Terapêutica (TSDT). As duas Técnicas Superiores de Saúde têm como função a coordenação, assim como verificação do Controlo de Qualidade Interno (CQI), responsabilidade pelo Controlo de Qualidade Externo e validação técnica dos resultados, assim como a visualização das lâminas dos esfregaços de sangue periférico e citoesfregaços. As TSDT certificam-se que todas as amostras são analisadas assim como o CQI, preparam esfregaços sanguíneos e citoesfregaços podendo também fazer a sua visualização.

Nesta secção realizam-se Hemogramas, Esfregaços de Sangue Periférico, Velocidades de Sedimentação Eritrocitária (VS), Gasometrias arteriais e venosas, a determinação de Hemoglobina Glicada (HbA_{1c}) e de Frações de Hemoglobina, a contagem total e diferencial de células de líquidos biológicos, que não o sangue e seus derivados, e Espermiogramas.

Esta secção participa em dois programas internacionais de avaliação de qualidade: o RIQAS (*Randox International Quality Assessment Scheme*) que permite avaliar as determinações do hemograma, VS, HgA_{1c} e as gasometrias enquanto que o NEQAS (*External Quality Assessment Services*) possibilita a avaliação de esfregaços de sangue periférico, tanto no que diz respeito à morfologia celular como à contagem diferencial leucocitária. Este processo de revisão por pares, atesta a capacidade que o laboratório tem no processamento de resultados precisos e exatos e fornece assim o reconhecimento da competência do laboratório em relação aos restantes.

O sangue é colhido para um tubo contendo o sal tripotássico de ácido etilenodiamino tetra-acético (K₃EDTA) quando as análises pretendidas são o Hemograma, a VS e a HbA_{1c} visto que este leva à completa anti-coagulação do sangue, formando um complexo estável com o cálcio, sem comprometer as estruturas celulares sanguíneas (McNamara,2017). Para as análises de gasometrias arterial ou venosa, o sangue arterial ou venoso é colhido em seringas com Heparina-Lítio.

As etiquetas utilizadas para identificação das amostras incluem diferentes informações. No caso particular da Hematologia, possuem ainda informações adicionais, “H” corresponde

a Hemograma; “VS” a velocidade de sedimentação; “CBC” que significa *complete blood count*, uma análise que não disponibiliza as subpopulações leucocitárias, solicitado em casos específicos por ser mais célere, muitas vezes utilizado pelo Hospital de Dia e durante ou após uma cirurgia quando só se necessita de um parâmetro como é exemplo a hemoglobina; “E” que corresponde a pedido de esfregaço. Em situações críticas/emergentes (Via Verde coronária, Via verde sépsis, bloco operatório), em contexto de Hospital de Dia (quimioterapia) as amostras são sinalizadas com uma etiqueta laranja para que sejam processadas de forma prioritária.

No decorrer do estágio neste setor tive a oportunidade de integrar a equipa de trabalho de rotina, tanto no processamento das amostras e controlos de qualidade interno nos diferentes equipamentos, como na realização das análises e observação de esfregaços de sangue periférico e citoesfregaços. De referir que no setor de Hematologia, para além das análises hematológicas, são realizadas outras relacionadas com análise de células não sanguíneas que também são abordadas neste Relatório.

I. Hemograma

I.1. Parâmetros incluídos e princípio de funcionamento do autoanalisador

O hemograma inclui o seguinte conjunto de parâmetros: i) contagem de eritrócitos, hematócrito, Volume Corpuscular Médio (MCV), concentração de hemoglobina, Hemoglobina Corpuscular Média (MCH), Concentração Hemoglobina Corpuscular Média (MCHC), dispersão do Volume Eritrocitário (RDW [%]), contagem e percentagem de eritroblastos e o pedido de reticulócitos inclui a sua contagem e percentagem, fração de reticulócitos imaturos e Equivalente de hemoglobina reticulocitária; ii) determinação do número de leucócitos e contagem diferencial em neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos ou ainda células precursoras linfocíticas ou granulocíticas e iii) contagem de plaquetas, determinação do Volume Plaquetar Médio (MPV) e da Dispersão do Volume Plaquetar (PDW).

O equipamento utilizado neste setor para a realização do hemograma é o XN-2000 da *Sysmex Corporation*, constituído por duas subunidades acopladas, sendo que ambos realizam o hemograma. A subunidade 1 está configurada com um canal próprio para o processamento de líquidos biológicos e a subunidade 2 tem um canal dirigido para a contagem de reticulócitos e de plaquetas por fluorescência.

A contagem dos eritrócitos, das plaquetas e a determinação do hematócrito fazem-se pelo método da impedância com focagem hidrodinâmica, pela medição da alteração da resistência durante a passagem de uma célula através de uma pequena abertura definida entre dois elétrodos. A focagem hidrodinâmica permite diminuir fenómenos de coincidência

(passagem de duas células ao mesmo tempo), uma vez que o fluxo de amostra é revestido com um fluido de fluxo de revestimento (*sheat stream*) que reduz o diâmetro de fluxo para o tamanho da célula e faz assim o isolamento de células individuais. As células passam através do campo elétrico sempre alinhadas devido à turbulência entre os elétrodos. Os impulsos elétricos resultantes são proporcionais ao volume das células e são exibidos em histogramas (Lehner *et al.*, 2007). Este método permite uma boa discriminação entre eritrócitos de tamanho reduzido e plaquetas e detetar mudanças subtis nas curvas de distribuição dos eritrócitos e o reconhecimento de várias populações eritrocitárias em utentes com anemias por deficiência de ferro, por exemplo (Fujimoto, 1999). O hematócrito é a soma de todos os impulsos gerados pelos eritrócitos. O Índice de Dispersão do volume eritrocitário (RDW) é calculado a partir do gráfico e expresso como desvio padrão (SD) em fL ou como coeficiente de variação (CV), em percentagem, sendo esta última a mais utilizada. Os índices hematimétricos são calculados automaticamente e são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Equações para o cálculo dos índices hematimétricos.

Índice	Equação
Volume Corpuscular médio (MCV)	$MCV (fL) = \frac{HCT(\%)}{RBC(x10^6 / \mu L)} \times 10$
Hemoglobina Corpuscular Média (MCH)	$MCH (pg) = \frac{HGB(g/dL)}{RBC(x10^6 / \mu L)} \times 10$
Concentração Hemoglobina Corpuscular Média (MCHC)	$MCHC (g/dl) = \frac{HGB(g/dL)}{HCT(\%)} \times 100$

A concentração em hemoglobina é obtida pelo método do Lauril Sulfato de Sódio (SLS), um método alternativo ao tradicional método da cianometahemoglobina, livre de cianeto. O SLS é um detergente que lisa os eritrócitos e forma um complexo com a hemoglobina, convertendo-a a metahemoglobina, sendo esta uma conversão rápida e o produto final relativamente estável. Este complexo é medido por espectrofotometria, pela leitura da absorbância a 539 nm, proporcional à concentração de hemoglobina da amostra. A principal vantagem deste método é que o reagente não é tóxico e é biodegradável (Karsan *et al.*, 1992).

A citometria de fluxo por fluorescência aliada a focagem hidrodinâmica é usada para fazer a contagem diferencial de leucócitos, eritroblastos (*nucleated red blood cells-NRBC*), reticulócitos e a contagem de plaquetas por fluorescência. A marcação das células ocorre após permeabilização da sua membrana e de um marcador de fluorescência que se liga especificamente aos ácidos nucleicos e proteínas nos organelos citoplasmáticos. Um feixe de luz semiconductor é direcionado para as células que passam pela unidade de fluxo. A luz

dispersa para a frente, a luz dispersa lateral e a luz fluorescente lateral são captadas pelo fotodiodo e convertidas em impulsos elétricos (Briggs *et al.*, 2012). A luz dispersa para a frente fornece informações sobre o tamanho das células, a luz dispersa lateral fornece informação sobre a estrutura intracelular e a luz fluorescente lateral fornece informações sobre o conteúdo de DNA/RNA. Células com propriedades físicas e químicas semelhantes formam grupos nos diagramas de dispersão dos diferentes canais.

O autoanalisador Sysmex XN-2000 tem 5 canais para fazer a avaliação dos múltiplos parâmetros. O canal WNR é dedicado a leucócitos e eritroblastos. O canal WDF faz a contagem diferencial de leucócitos em neutrófilos e basófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos. O canal WPC deteta células anormais, como leucócitos imaturos ou linfócitos atípicos. O canal PLT-F faz a determinação de plaquetas com maior precisão, especialmente em baixas contagens, assim como da fração de plaquetas imaturas (IPF). O canal RET determina reticulócitos, reticulócitos imaturos e o parâmetro “Equivalente de Hemoglobina Reticulocitária” (Schoorl *et al.*, 2015; Lehner *et al.*, 2007; Briggs *et al.*, 2012).

Associado ao autoanalisador encontra-se a Unidade de Processamento de Informações, que processa e apresenta dados gerados pelo equipamento. Este *software* integra um conjunto de regras pré-definidas, previamente validadas pela responsável da secção, por exemplo, microcitose e macrocitose, anemia, agregação de eritrócitos por suspeita de existência de aglutininas frias, trombocitose ou trombocitopenia, agregados plaquetários, linfocitose, linfócitos atípicos, granulócitos imaturos ou células blásticas. Isto permite uma padronização e diminuição de erros, pois independentemente do utilizador, as normas são aplicadas. Esta ferramenta possibilita a validação automática de hemogramas que são enviados diretamente para o *Clinidata XXI*, ou retém aqueles que precisam de análise prévia (consulta de histórico, verificação de coágulo, homogeneização, estufa, observação de esfregaço) antes de serem validados. Visto que um único tubo de sangue colhido em K₃EDTA permite realizar não só hemograma como também VS, HbA_{1c} e análise do peptídeo natriurético do tipo B (BNP) a referida Unidade de Processamento de Informações tem também um alerta para a realização destas análises facilitando assim a sua triagem. Esta mesma Unidade, graças às características supracitadas, permite uma maior gestão de recursos tanto materiais como pessoais, visto que devido ao número elevado de utentes seria inoportuno fazer a validação técnica de todos os hemogramas individualmente.

Relativamente ao Controlo de Qualidade Interno, é processado em 3 níveis: nível I (baixo), nível II (normal) e nível III (alto) para sangue periférico colhido com K₃EDTA e também há controlo de fluidos biológicos que não o sangue, para a subunidade I tanto nível I como nível II. No sentido de rentabilizar recursos, estes controlos são realizados em dias

alternados e o controlo de qualidade interno referente aos fluídos biológicos é efetuado sempre que existem amostras. Os tubos com as amostras do Controlo de Qualidade encontram-se no frigorífico, deve-se permitir que estabilizem a temperatura ambiente durante 30 minutos, agitam-se durante 5 minutos e colocam-se num *rack* com as demais amostras. O autoanalisador dará um sinal se algum dos parâmetros das amostras de controlo não se encontrar no intervalo entre o limite superior e inferior, definidos pelas cartas de controlo.

1.2. Interpretação do hemograma

1.2.1. Eritrócitos

As determinações relacionadas com os eritrócitos são a sua contagem, o hematócrito, o Volume Corpuscular Médio (MCV), a concentração de hemoglobina, a Hemoglobina Corpuscular Média (MCH), a Concentração Hemoglobina Corpuscular Média (MCHC), a dispersão do Volume Eritrocitário (RDW [%]), a contagem e a percentagem de eritroblastos. Quanto à requisição de reticulócitos, esta inclui a sua contagem e percentagem, a fração de reticulócitos imaturos e o “Equivalente de hemoglobina reticulocitária”.

Os eritrócitos são produzidos na medula óssea num processo altamente regulado por fatores de crescimento, denominado eritropoiese. O proeritroblasto, a primeira célula da linha eritroide identificável na medula óssea, apresenta núcleo central com nucléolos e basofilia citoplasmática que se deve aos ribossomas e sofre quatro mitoses dando origem ao eritroblasto basófilo. As mitoses do eritroblasto basófilo dão origem ao eritroblasto policromatófilo, assim denominado pois apresenta policromatofilia devido à crescente produção de hemoglobina acidófila e à presença de ácido ribonucleico. No final da mitose do eritroblasto basófilo, o núcleo torna-se picnótico, originando o eritroblasto ortocromático. Após a expulsão do núcleo, a célula denomina-se reticulócito, que é policromatófilo devido à presença de ácido ribonucleico (Mathur *et al.*, 2012).

Os reticulócitos permanecem na medula óssea entre 24 a 48 horas antes de serem libertados na corrente sanguínea e fornecem uma medida quantitativa da eritropoiese em caso de anemia, embora não forneçam informações quanto à sua qualidade, permitindo a diferenciação entre anemias hipoproliferativas e anemias hiperproliferativas (Briggs, Bain, 2017).

A percentagem de reticulócitos pode ser afetada pelo seu tempo de maturação, que ocorre tanto na medula óssea como no sangue periférico e pelo número de eritrócitos circulantes. A diminuição na contagem de eritrócitos causa um aumento na contagem percentual de reticulócitos. Hemólise ou anemia levam à estimulação da eritropoiese e os

reticulócitos são libertados da medula prematuramente, resultando num maior tempo de circulação destes e elevada contagem. No sentido de evitar uma estimativa elevada do número de reticulócitos, o índice de Produção de Reticulócitos é utilizado, sendo baseado no tempo de maturação de reticulócitos no sangue (Mathur *et al.*, 2012; Pierre, 2002).

A hemoglobina reticulocitária é a medida do teor médio de hemoglobina da fração reticulocitária dos eritrócitos na circulação periférica. É um reflexo da hemoglobinizacão dos eritrócitos que foram produzidos pela medula óssea nos últimos dois dias, permitindo, assim, avaliar a qualidade dos eritrócitos em desenvolvimento. A fração de reticulócitos imaturos (FRI) pode ser utilizada na monitorização da eritropoiese.

Estas determinações permitem o despiste de várias patologias, nomeadamente anemias e hemoglobinopatias. As anemias podem ser causadas por perda de sangue, diminuição da produção de eritrócitos e aumento da destruição dos mesmos e são detetadas pela diminuição da concentração de hemoglobina e dos eritrócitos de acordo com os valores de referência para idade e sexo (Elghetany, Banki, 2012).

O MCV indica o volume médio de cada eritrócito e permite classificar os tipos de anemias em microcíticas se o valor for menor do que 80 fL, normocíticas se for entre 80 e 97 fL e macrocíticas se o mesmo exceder os 97 fL. É relativamente estável, por isso, quando há uma variação considerável, a Unidade de Processamento de Informações anexada ao autoanalisador retém a amostra para validação manual, no sentido de se avaliar, por exemplo, se há a possibilidade de troca de identificação.

O MCH simboliza a hemoglobina existente em cada eritrócito e o MCHC é calculado a partir da concentração de hemoglobina e do hematócrito e expressa a concentração de hemoglobina média em cada eritrócito. Estes dois índices definem as anemias quanto à concentração em hemoglobina. Anemias hipocrómicas (MCH inferior a 27 pg) e microcíticas estão associadas a deficiências em ferro, talassémias, doença crónica, sideroblástica congénita, deficiência em cobre ou intoxicação por chumbo. Anemias normocrómicas (MCH entre 26 e 34 pg) e normocíticas indicam perda aguda de sangue, doenças renais ou falência medular. As anemias normocrómicas e macrocíticas estão associadas a anemias hemolíticas visto que os reticulócitos são maiores do que os eritrócitos, contudo o MCV depende não só do grau de reticulocitose, como da presença de esferócitos ou outras formas anormais de eritrócitos (Win, Richards, 2017). As anemias macrocíticas dividem-se em megaloblásticas, devido a deficiência em vitamina B₁₂ ou ácido fólico e não-megaloblásticas, quando se devem a hepatopatias mielodisplásicas, fármacos citotóxicos ou alcoolismo crónico (Hoffbrand, Moss, 2011a).

Um valor elevado de MCV isolado, despoleta o *flag* “Aquecer amostra a 37°C”, pois pode dever-se à presença de aglutininas frias, anticorpos que aglutinam os eritrócitos a baixas temperaturas e levam a hemaglutinação. É competência do técnico avaliar se esta ação é ou não benéfica, pois se a contagem de eritrócitos se encontrar normal, descarta-se a possibilidade de aglutininas frias.

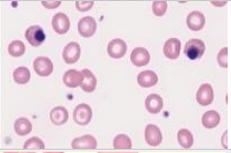
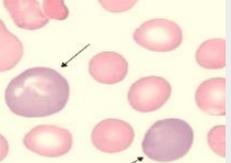
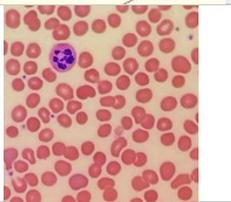
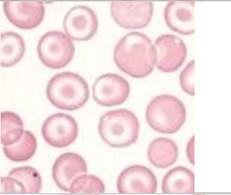
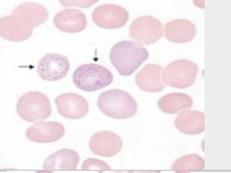
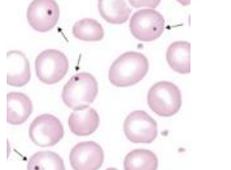
O valor de RDW expressa o grau de anisocitose e é inversamente proporcional à homogeneidade da população de eritrócitos. Auxilia no diagnóstico diferencial de anemias, particularmente na distinção entre a talassémia *minor*, com população eritrocitária homogênea, e a anemia ferropénica, caracterizada por população heterogénica. O RDW é também elevado após transfusões sanguíneas ou após terapêutica para a anemia devido a populações dimórficas (Matos *et al.*, 2008).

Um número elevado de eritroblastos pode ser encontrado em casos de anemias abruptas e é característico de disfunções hemolíticas do recém-nascido. Pode encontrar-se associado à presença de precursores granulocíticos e leucocitose e denominar-se reação leucoeritroblástica, causada por corticosteroides e infeção generalizada, por exemplo. A presença de mais de 20% de eritroblastos indica anemia hemolítica, síndrome mielodisplásica ou mielofibrose (Bain, 2017).

1.2.1.1. Morfologia e alterações morfológicas dos eritrócitos

No estudo da morfologia dos eritrócitos e das suas alterações é importante ter em atenção não só o número, como o tamanho, cor e a sua forma, assim como ter em conta as formas imaturas presentes. Assim, a diminuição da contagem de eritrócitos associa-se a anemia e ao aumento associa-se poliglobulia. Para o diagnóstico diferencial de anemia ou de outras patologias é importante a identificação de variações na forma e de inclusões (Bain, Path, 2005). Para a observação dos eritrócitos deve escolher-se uma zona da lâmina fina o suficiente para que estes estejam individualizados mesmo que um pouco sobrepostos. Na Tabela 3 encontram-se descritas a morfologia dos eritrócitos assim como algumas alterações associadas a determinadas patologias que tive oportunidade de observar aquando da passagem pela valência de Hematologia.

Tabela 3 - Morfologia e alterações morfológicas dos eritrócitos.

Imagem	Descrição e possíveis causas
	Eritrócitos - células de cor rosa, em forma de disco bicôncavo do tamanho do núcleo de um pequeno linfócito.
	Eritroblastos picnóticos - núcleo pequeno e citoplasma levemente policromatofílico.
	Reticulócitos - policromatofilia, correspondente aos grânulos de RNA, que originam cinzento-azulado.
	Macrócitos e neutrófilo hipersegmentado - alcoolismo crônico.
	Esferócitos - podem ser causados por esferocitose hereditária ou queimaduras graves
	Células em alvo - anemias ferropénicas, talassémia.
	Pontuado basófilo (setas), fragmentos de RNA desnaturados - Em talassémias, infecções graves, anemia sideroblástica e anemia megaloblástica.
	Corpos de Howell-Jolly - remanescentes de DNA normalmente observados em pacientes esplenectomizados, anemia megaloblástica ou anemia hemolítica.

Adewoyin, Nwogoh, 2014; Hoffbrand, Green, 2005; Bain, 2017. Imagens adaptadas de Rodak, Carr (2017) ou fotografadas no Serviço de Patologia.

1.2.2. Leucócitos

A análise de leucócitos consiste na determinação do seu número e na sua contagem diferencial em neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos ou, ainda, em células precursoras linfocíticas ou granulocíticas.

Esta análise é de grande relevância em algumas situações, como por exemplo em utentes com cancro sujeitos a quimioterapia. De facto, os utentes que vão ser submetidos a quimioterapia no Hospital de Dia da ULSAM devem ter, no mínimo, um valor de $1,5 \times 10^9$ neutrófilos por litro, um valor que é relativamente elevado, tendo em conta que a tendência é ocorrer a sua diminuição após o procedimento (Göller *et al.*, 2011).

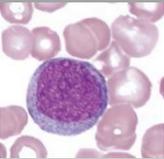
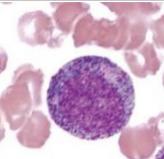
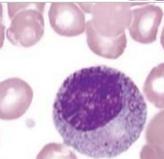
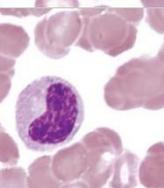
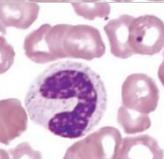
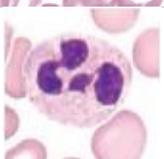
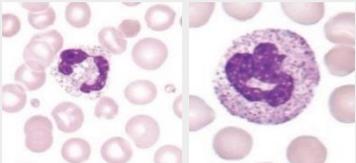
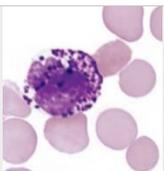
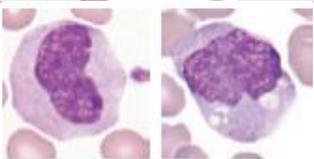
Como se sabe, a leucopenia, principalmente devida a neutropenia leva a um maior risco de infeção bacterianas oportunistas ou por fungos. Uma vez que estes valores são um fator decisivo para se realizar quimioterapia ou não, pode-se justificar fazer a observação de um esfregaço de sangue periférico quando o utente tem mais de $1,4 \times 10^9$ /l de neutrófilos e uma grande percentagem de granulócitos imaturos, nomeadamente metamielócitos que estão na fase final de maturação.

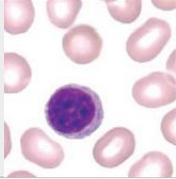
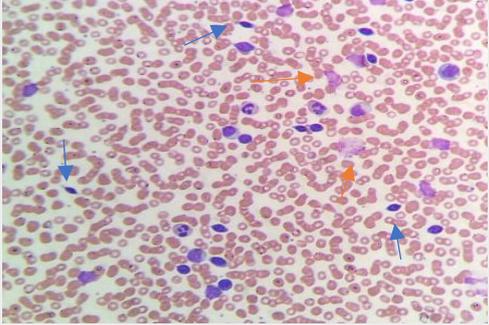
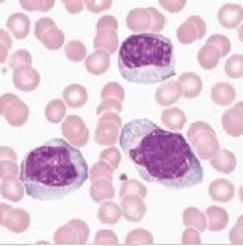
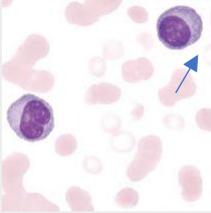
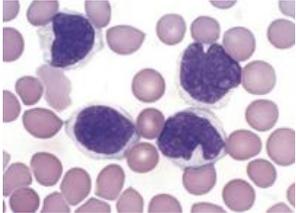
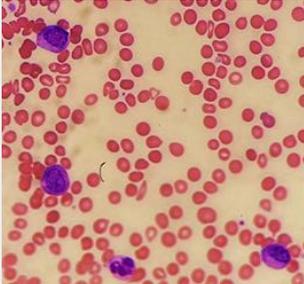
Recém-nascidos, grávidas e pessoas que foram submetidas a cirurgia têm granulócitos imaturos no sangue periférico. A presença de granulócitos no sangue periférico pode significar uma resposta precoce a uma infeção ou inflamação.

1.2.2.1. Morfologia e alterações morfológicas dos leucócitos

No sangue periférico a proporção dos diferentes leucócitos varia com a idade, podendo também variar devido a patologias associadas. Nos adultos, os neutrófilos são os mais abundantes, perfazendo cerca de 40 a 75% de leucócitos, os linfócitos estão entre 20 a 45%, monócitos 2 a 10%, eosinófilos de 1 a 6%, e basófilos menos de 1% (Adewoyin, Nwogoh, 2014). A avaliação do esfregaço de sangue auxilia ainda em diagnósticos específicos, como são os casos da síndrome mielodisplásica, leucemia ou linfoma quando estes têm expressão no sangue periférico (Bain, Path, 2005). A Tabela 4 apresenta a descrição e imagens de leucócitos e alguns dos seus percursores, assim como de alterações morfológicas e patologias a si associadas com as quais tive oportunidade de contactar.

Tabela 4 - Morfologia e alterações morfológicas dos leucócitos.

Imagem	Descrição e possíveis causas
	<p>Mieloblasto - alta relação núcleo/citoplasma, contendo nucléolos (sinal de imaturidade) e cromatina fina. Citoplasma escasso e basófilo não contém grânulos.</p>
	<p>Promielócito - grânulos primários dispersos, ainda com nucléolos visíveis, mas a cromatina mais condensada e com citoplasma mais abundante.</p>
	<p>Mielócito neutrófilo - núcleo redondo e excêntrico, sem nucléolos e possui grânulos secundários.</p>
	<p>Metamielócitos - núcleo em forma de rim.</p>
	<p>Forma em bastão - sem divisão filamentosa entre os lóbulos nucleares. Um aumento destas formas ocorre em situações de infecção e inflamação assim como na gravidez.</p>
	<p>Neutrófilos - três a cinco segmentos nucleares conectados por filamentos de cromatina e citoplasma com grânulos primários e secundários.</p>
	<p>Neutrófilos com granulações tóxicas - infecção bacteriana, administração do fator estimulante de colônias de granulócitos e anemia aplástica. Granulações tóxicas e vacuolização são características de sepsis.</p>
	<p>Eosinófilo - Eosinofilia observa-se principalmente em parasitoses, alergias, leucemia aguda ou doenças mieloproliferativas.</p>
	<p>Basófilo - núcleo bilobado e grânulos que contém histamina, serotonina e leucotrienos que cobrem toda a superfície da célula. A basofilia é frequente em pacientes com mielofibrose e policitemia vera e particularmente na leucemia mieloide crônica.</p>
	<p>Monócitos - são as maiores células maduras encontradas no sangue periférico, com citoplasma abundante azul-acinzentado, podem conter grânulos ou vacúolos e núcleo indentado com a cromatina levemente condensada.</p>

	<p>Linfócitos - núcleo redondo com cromatina condensada e citoplasma azul podendo também ser possível visualizar linfócitos maiores apresentando maior conteúdo citoplasmático e grânulos azurofilicos.</p>
<p>Patologias associadas a alterações morfológicas</p>	
	<p>Leucemia linfocítica crônica - linfocitose persistente. Afeta principalmente a população idosa. Setas azuis- linfócitos com prolongamentos citoplasmáticos e cromatina laxa Setas laranja- manchas de Gumprecht.</p>
	<p>Mononucleose infecciosa (vírus <i>Epstein-Barr</i>) - Linfócitos atípicos, grandes, com abundante citoplasma hiperbasófilo e vacúolos e a cromatina é laxa. A membrana citoplasmática parece indentada, caso os linfócitos atípicos entrem em contacto com outras células.</p>
	<p>Mieloma múltiplo - rouleaux eritrocitário associado a uma velocidade de sedimentação muito aumentada e elevado número de plasmócitos (seta azul) com citoplasma hiperbasófilo e núcleo excêntrico.</p>
	<p>Linfoma do Manto - linfoma dos linfócitos B e morfológicamente é caracterizado por pequenos linfócitos irregulares com núcleo clivado, “centrócito-like”.</p>
	<p>Mielofibrose Primária - proliferação clonal de múltiplas linhagens celulares e fibrose da medula óssea devido à hiperplasia de megacariócitos, com estimulação de fibroblastos, e esplenomegalia devia a hematopoiese extra-medular. O esfregaço de sangue periférico revela anisopoiquilciose com dacriócitos e ovalócitos e reação leucoeritroblastica.</p>

Bain, 2017; Jamieson, Hays, 2008; Ravandi, Hoffman, 2005; Mathur *et al.*, 2007; Jamieson, Hays, 2008; Hutchison, Abraham Jr, 2012; Avivi, Goldstone, 2005; Vassiliou, Green, 2011. Imagens adaptadas de Rodak & Carr (2017) ou captadas no Serviço de Patologia.

1.2.3. Plaquetas

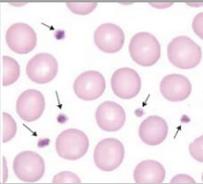
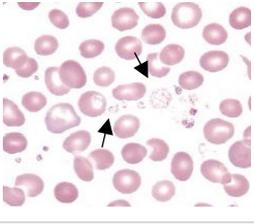
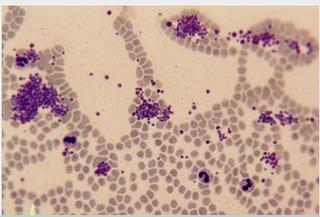
Como já foi referido, a análise às plaquetas envolve a sua contagem e as determinações do Volume Plaquetar Médio (MPV) e da Dispersão do Volume Plaquetar (PDW).

Existem alguns fatores passíveis de induzir pseudotrombocitopenia, diminuição na contagem de plaquetas *in vitro*, pela formação de agregados plaquetares. Estes agregados podem formar-se devido não só a uma colheita incorreta, sendo esta situação irreversível, mas pode também ocorrer devido ao anticoagulante. Neste caso pode-se tentar repetir a análise após submeter a amostra a vortex durante cerca de 2 minutos, contudo esta ação apenas é eficiente em 2/3 dos casos (Prates *et al.*, 2017). É sempre necessário voltar a confirmar por lâmina se a correção da contagem foi total. Caso seja necessário convoca-se o utente para nova colheita e esta será realizada noutra tubo que o serviço da ULSAM tem disponível para o estudo de possíveis pseudotrombocitopenias, o Tromboexact da Sarsted. Se existirem plaquetas macrocíticas ou eritrócitos microcíticos pode haver um erro nas contagens e os gráficos apresentam anomalias. O autoanalisador Sysmex XN-2000 faz essas determinações por fluorescência, diminuindo as interferências de fragmentos de eritrócitos e leucócitos assim como eritrócitos microcíticos. É também fornecida a fração de plaquetas imaturas, que traduz a eficácia da megacariopoiese, auxiliando assim o diagnostico diferencial de trombocitopenias diferenciando entre destruição periférica ou hemorragias e falência ou supressão medular.

1.2.3.1. Morfologia e alterações morfológicas das plaquetas

A fragmentação do citoplasma do megacariócito origina entre mil a cinco mil plaquetas, células anucleadas com formas irregulares entre 1 a 3 μm de diâmetro (Hoffbrand, Moss, 2011b). Quando a Unidade de Processamento de Informações alerta para trombocitopenia, o esfregaço deve ser observado, tanto para a sua confirmação como para a sua possível causa. Pelo contrário, a trombocitose pode dever-se a inflamação ou hemorragia se não exceder $1000 \times 10^9/\text{l}$. Se o aumento for muito elevado e associado a anisocitose plaquetária, com observação de algumas plaquetas tão grandes como eritrócitos e hipogranulares e se o utente não se encontra em estado crítico ou com hipersplenia, tal situação pode estar associada a doença mieloproliferativa (Bain, 2017). A Tabela 5 apresenta a morfologia normal assim como alterações na morfologia plaquetária com as quais contactei.

Tabela 5 - Morfologia e alterações morfológicas das plaquetas

Imagem	Descrição
	<p>Plaquetas apresentam um formato irregular, contendo grânulos de cor roxa e tamanho reduzido entre 1 a 3 µm.</p>
	<p>Plaquetas grandes ou gigantes (do tamanho de eritrócitos) podem estar presentes em algumas situações, nomeadamente trombocitopenia imune ou síndromes mieloproliferativas.</p>
	<p>Agregados plaquetares. Se a Unidade de Processamento de Informações alerta para possível coagulação devido a trombocitopenia, sem histórico apreciável deve procurar-se por agregados plaquetares, principalmente na franja do esfregaço periférico já que é aqui que se vão depositar.</p>

Bain, 2017. Imagens adaptadas de Rodak & Carr (2017) e do site (em 03/03/2019): <https://imagebank.hematology.org/image/17753/platelet-clump-in-peripheral-blood-smear>

1.3. Esfregaços de sangue periférico

Esfregaços de sangue periférico são efetuados sempre que há um pedido inicial pelo clínico ou perante determinados valores ou alterações no hemograma. A título de exemplo, a presença de granulócitos imaturos *de novo*, possível presença de eritroblastos, trombocitopenia, linfocitose, linfócitos atípicos, inversão da fórmula leucocitária, eosinofilia ou monocitose requerem a sua realização. O objetivo de executar um esfregaço de sangue é este ser examinado microscopicamente para verificar a contagem ou confirmar a presença de células anormais, sendo que a decisão final é do técnico que esteja a validar os hemogramas, visto que tem de se ter em conta a situação clínica do utente e do seu histórico. Os esfregaços de sangue periférico são preparados a partir do tubo de K₃EDTA devidamente homogeneizado, ao qual se coloca um adaptador *Heamo-Diff*, que permite dispensar uma gota na lâmina de vidro e fazer a sua extensão, diminuindo assim o contacto com o sangue (Figura 1A). O esfregaço deve ter dois terços do comprimento da lâmina deve ter uma extremidade oval (Figura 1B).

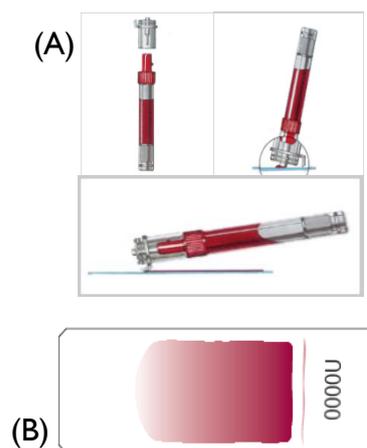


Figura 1. (A) Adaptador Heamo-Diff dispensa uma gota na lâmina e permite a sua extensão. (B) O esfregaço deve ter dois terços do comprimento da lâmina deve ter uma extremidade oval. (<http://vitaros.ru/content/vakuum/sarstedt/s-monovet>)

A espessura ideal permite que, ao observar ao microscópio, exista alguma sobreposição de eritrócitos ao longo de grande parte do comprimento da lâmina e os leucócitos devem ser facilmente reconhecíveis durante a maior parte do esfregaço (Bain, 2017; Adewoyin, Nwogoh, 2014). Deve-se então identificar o esfregaço com o número do tubo na zona fosca da lâmina e deixar secar.

A coloração das lâminas é automatizada pelo *Hematek Slide Stainer*, pela coloração de Wright-Giemsa. Esta é uma coloração de *Romanowsky* modificada constituída por uma combinação de corantes básicos, o azul de metileno e seus produtos oxidativos, *azure A* e *azure B* e um corante ácido, eosina. O equipamento possui três reagentes, o corante, a solução-tampão e a solução de lavagem. O corante é dissolvido em metanol, excipiente e fixador, a solução-tampão ioniza os sais para que haja a ligação com as estruturas celulares e a solução de lavagem elimina o excedente. Ácidos nucleicos e nucleoproteínas são corados por corantes básicos e, por conseguinte, designados basofílicos. Estruturas que fixam com corantes ácidos são acidófilas ou eosinofílicas, sendo o exemplo a hemoglobina e outros componentes citoplasmáticos como grânulos de eosinófilos (Vajpayee *et al.*, 2012). Esta coloração permite visualizar eritrócitos de cor rosa, núcleos de leucócitos que são com tons de azul a roxo e plaquetas com citoplasma lilás escuro contendo grânulos vermelho arroxeado (Dunning, Safo, 2011).

2. Velocidade de Sedimentação Eritrocitária (VS)

A velocidade de sedimentação é determinada pelo autoanalisador *Ves-Matic 30*. Este, utiliza um método que pode ser comparado ao método de referência *Westergreen*, que mede a sedimentação dos eritrócitos em sangue diluído após 1 hora num tubo de vidro de 30 cm de comprimento e 2,55 mm de diâmetro, montado verticalmente num suporte, sendo que a duração da análise por este sistema apenas é de 28 minutos devido ao facto dos tubos estarem inclinados 18° em relação ao eixo vertical e a análise é feita por leitura ótica. A sedimentação dos eritrócitos ocorre em três fases, a primeira com a formação de *rouleaux* e agregação seguindo-se da acumulação dos agregados no tubo a uma velocidade estável e, por último, a diminuição dessa velocidade à medida que mais agregados se acumulam (Osei-Bimpong, Burthem, 2017).

Como controlo de qualidade interno, o laboratório utiliza o sangue controlo com nível 1 e nível 2. Os valores de referência para homens são entre 1 mm e 10 mm e para mulheres entre 1 mm e 15 mm, na primeira hora. Embora seja considerada um parâmetro analítico não específico, é bastante sensível e indicador de resposta inflamatória aguda de doenças

inflamatórias sistêmicas, neoplasias e gravidez e diminuir devido a policitemia vera, por exemplo.

Uma resposta inflamatória devido a danos tecidulares, também denominada resposta aguda, leva a alterações nas concentrações de determinadas proteínas, nomeadamente ao aumento não só das proteínas de fase aguda positivas, tais como a de proteína C reativa (PCR), fibrinogénio, haptoglobina e ferritina como também de imunoglobulinas e ainda há a diminuição da concentração de albumina e transferrina o que contribui para um aumento na velocidade de sedimentação. O mieloma múltiplo pela expressão excessiva de imunoglobulinas e a gravidez pelo aumento de fibrinogénio, assim como contraceção oral também levam a VS aumentada (Hoffbrand, Moss, 2011c). A VS também é utilizada para a monitorização da artrite reumatoide e tuberculose e pode ser um indicador de progressão para síndrome da Imunodeficiência Adquirida em portadores do vírus da imunodeficiência Humana (Osei-Bimpong, Burthe, 2017; Vajpayee *et al.*, 2012).

3. Curva de fragilidade osmótica

A curva de fragilidade osmótica analisa a capacidade dos eritrócitos absorverem água, sem que ocorra a sua lise, dependendo isto da relação entre volume e superfície. A sua maior



Figura 2. Curva de fragilidade osmótica. A amostra é submetida a doze soluções hipotónicas de concentrações cada vez menores de NaCl. Os tubos são numerados de 1 a 12 (da esquerda para a direita), sendo que o tubo número 1 tem a maior concentração e o 12 a menor. [Foto captada no Serviço de Patologia.]

utilidade é no diagnóstico de Esferocitose Hereditária. A Esferocitose Hereditária deve-se a mutações nas proteínas da membrana do eritrócito, nomeadamente na anquirina, α -espectrina, β -espectrina, banda 3 ou proteína 4.2 e o suporte do citoesqueleto não é adequado, alterando a forma bicôncava para esférica. Assim, os esferócitos têm uma relação de volume e superfície aumentada e a sua capacidade para acumular a água é mais reduzida levando a fragilidade osmótica aumentada (Layton, Roper, 2017).

O teste implica que a amostra seja submetida a doze soluções hipotónicas de concentrações cada vez menores de cloreto de sódio (NaCl) (Figura 5). Numa amostra de pessoa saudável, a hemólise inicial começa no tubo com 0,44% de NaCl e a hemólise completa acontece com 0,32% de NaCl. Em utentes portadores de Esferocitose Hereditária, a hemólise inicial acontece com uma percentagem de 0,68% de NaCl e a hemólise completa acontece

com 0,46% de NaCl. Visto que a leitura deste teste não se faz com espectrofotómetro, mas sim visualmente, a amostra é também enviada para o exterior para a realização do teste da eosina-5-maleimida, protocolo com os Hospitais da Universidade de Coimbra.

4. Hemoglobina Glicada

A *Diabetes Mellitus* é uma doença metabólica, caracterizada por hiperglicemia e perturbações no metabolismo de proteínas, lípidos e hidratos de carbono, em consequência da deficiente secreção e/ou ação da insulina. A hemoglobina glicada A1c (HbA1c) é principalmente determinada por rotina em todas as pessoas com *Diabetes Mellitus*, para avaliar o grau de controlo glicémico (WHO, 1999; DGS, 2011).

A glicação da hemoglobina consiste numa ligação não enzimática espontânea do grupo aldeído da glicose com a valina livre da hemoglobina, formando assim a base de Schiff's que é reversível, podendo dissociar-se ou formar uma cetamina estável, a hemoglobina glicada (Bem, Kunde, 2006). A formação da HbA1c é proporcional à concentração plasmática de glicose e à duração da hiperglicemia, visto que a vida média dos eritrócitos é de cerca de 120 dias, esta indica a concentração de glicose sanguínea nos 120 dias anteriores.

O autoanalisador Menarini Arkray HA-8160, através do Método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) de troca iónica com fase inversa, permite realizar a separação da hemoglobina, determinando a hemoglobina glicada assim como as frações de Hemoglobina A2, Hemoglobina A1 e hemoglobina F – Modo Diabetes e Talassemia (Braconnier, 2004). O sistema hemolisa 4 µl de sangue total e as diferentes frações de hemoglobina, carregadas negativamente, ligam-se à coluna que é composta por uma resina de natureza catiónica. A hemoglobina glicada é eluída em primeiro lugar, uma vez que tem maior densidade de cargas negativas. Os resultados são calculados a partir das áreas dos picos das diferentes frações e apresentados como percentagem da hemoglobina total (Thevarajah *et al.*, 2008).

Uma pessoa não diabética tem uma percentagem de HbA1c entre 4 a 6% enquanto que uma pessoa diabética descompensada pode ter esse valor muito maior, sabendo-se que a partir de 7% leva a hiperglicémia não controlada, o que pode levar a problemas crónicos e complicações a longo prazo. Na determinação da hemoglobina glicada existem várias situações que afetam o seu doseamento entre elas: i) a presença de variantes de hemoglobina, hemoglobinopatias ou anemia hemolítica que diminuem a vida média dos eritrócitos e levam a resultados diminuídos falsos; ii) anemia ferropénica ou megaloblástica que aumenta a vida média dos eritrócitos e leva a resultados falsamente aumentados; iii) toma de ácido acetilsalicílico, alcoolismo crónico ou hipertrigliceridémia que levam a resultados elevados falsos (Grupo Interdisciplinar de Padronização da Hemoglobina Glicada, 2009).

5. Frações de Hemoglobina

Como já foi referido, para além da Hemoglobina Glicada, determina-se ainda Hemoglobina A₂, Hemoglobina A₁ e Hemoglobina F sendo ainda possível detetar a presença de variantes da hemoglobina.

A molécula de hemoglobina é um tetrâmero constituído por dois pares de cadeias polipeptídicas (α , β , δ e γ) ligadas não covalentemente, cada uma fortemente ligada a um grupo heme. A hemoglobina A (ou A₁) é composta por duas cadeias α e duas cadeias β e constitui cerca de 97% do total das hemoglobinas no adulto, a hemoglobina A₂ é composta por duas cadeias α e duas cadeias δ e representa entre 1,5% a 3,5% do total de hemoglobina e a hemoglobina F é formada por duas cadeias α e duas cadeias γ constituindo menos de 1% num indivíduo adulto (Elghetany, Banki, 2012; Wild, Bain, 2017). Defeitos na estrutura da hemoglobina são chamados hemoglobinopatias, como é exemplo a hemoglobina S característica da anemia falciforme.

Defeitos na quantidade de produção levam a talassémia. Os sinais e sintomas associados à talassémia surgem como consequência da produção inadequada de uma das cadeias de hemoglobina e da acumulação de outra cadeia, levando a anemia microcítica e hipocrómica, a eritropoiese ineficaz e hemólise (Wild, Bain, 2017). O tipo mais comum é a β -talassémia, havendo uma produção diminuída de cadeia β . A classificação clínica da β -talassémia baseia-se nos genes mutados e se a mutação é hétero ou homozigótica. A β -talassémia *major* deve-se a mutações homozigóticas e leva a anemias hemolíticas severas com necessidade de transfusões de suporte, a β -talassémia intermédia revela sintomas menos graves e a β -talassémia *minor* deve-se a uma mutação heterozigótica provocando anemia ligeira (Elghetany, Banki, 2012). Com a diminuição da produção da cadeia β , aumenta a produção de cadeias β -like, principalmente da cadeia δ o que leva ao aumento da hemoglobina A₂ até 8%, sendo este um dos principais métodos de diagnóstico (Elghetany, Banki, 2012).

6. Análise de células de outros Fluidos Biológicos

Sempre que se recebem outros fluidos biológicos, que não o sangue ou seus derivados, esses são processados pelo autoanalisador Sysmex XN-2000 subunidade I. No entanto, o equipamento tem de ser preparado, para que este faça limpeza ao sistema e uma análise de fundo, visto que o número de células nos outros fluidos biológicos é muito inferior ao do sangue periférico. Depois da análise, que inclui a contagem total de células (eritrócitos, leucócitos e outras células) e a sua contagem diferencial (polimorfonucleadas, monocleadas, eosinófilos e de elevada fluorescência) e se a contagem total for superior a 100 células/ μ l no

caso de Líquidos Pleurais, Sinoviais, Pericardiais ou Peritoniais deve-se realizar citoesfregaço para proceder à contagem diferencial em microscópio.

6.1. Líquido Cefalorraquidiano (LCR)

O Líquido Cefalorraquidiano é essencialmente formado nos plexos coroides através de ultrafiltração do plasma e transporte ativo, circula no espaço subaracnoide entre as membranas aracnoide e pia-máter. As principais funções do LCR são a proteção mecânica do Sistema Nervoso Central, regulação da pressão intracraniana, circulação de nutrientes e excreção de resíduos, mantendo a homeostasia (Ringsrud, Linné, 1995). As principais indicações para a recolha de LCR, por punção lombar, são infeção das meninges, hemorragia intracraniana, patologias do sistema nervoso central e patologias desmielinizantes. Um LCR normal é límpido, incolor e estéril (Ringsrud, Linné, 1995). A sua colheita é feita sequencialmente em 3 tubos separados, o primeiro tubo destina-se à análise bioquímica, o segundo à análise microbiológica e o terceiro à contagem e diferenciação celular. A contagem do número total de células do LCR faz-se em câmara de Neubauer melhorada.

É primordial distinguir entre uma hemorragia subaracnoide e uma punção traumática. Enquanto que se for devido a punção traumática o LCR vai ficando cada vez mais límpido à medida que se recolhem os 3 tubos para análise e o sobrenadante após centrifugação é límpido, numa hemorragia os 3 tubos mostram-se idênticos quanto à sua turvação e o sobrenadante é xantocrómico devido à hemólise dos eritrócitos (a lise dos eritrócitos após a recolha inicia-se entre uma a duas horas, por isso, deve-se fazer esta análise o mais rapidamente possível). A presença de eritrócitos crenados na amostra também pode ser indicativa de uma hemorragia subaracnoide.

A zona quadriculada do hemocitómetro é composta por nove quadrados de 1 mm^2 . Estes nove quadrados encontram-se subdivididos em três zonas distintas; quadrados de $0,25 \times 0,25 \text{ mm}$, quadrados de $0,25 \times 0,20 \text{ mm}$ e quadrados de $0,20 \times 0,20 \text{ mm}$. O quadrado central é segmentado em quadrados de $0,05 \times 0,05 \text{ mm}$. A profundidade da zona quadriculada é $0,1 \text{ mm}$ (Figura 2). No serviço de Hematologia as contagens de eritrócitos e leucócitos realizam-se nos quatro quadrados compostos por quadrados de $0,0625 \text{ mm}^2$ i.e., nos quadrados dos cantos superior e inferior, esquerdo e direito. O resultado é dividido por $0,4$ para se obter o número de células por mm^3 .

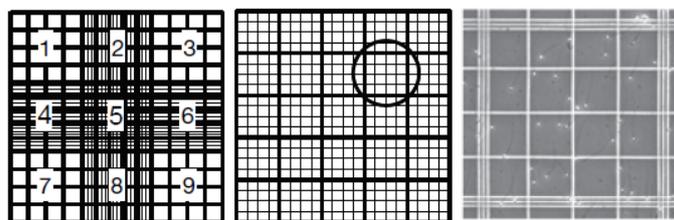


Figura 3. Câmara de Neubauer Melhorada. A zona quadriculada do hemocítmetro é composta por nove quadrados de 1 mm². Estes nove quadrados encontram-se subdivididos em três zonas distintas; quadrados de 0,25 x 0,25 mm (1,3,7 e 9 na imagem), quadrados de 0,25 x 0,20. [Adaptada de WHO (2010).]

Se a contagem de leucócitos e outras células exceder 10 células / μl , deve-se fazer a contagem diferencial após citocentrifugação. A citocentrifugação, devido às baixas rotações, permite preservar a morfologia celular. Após o citoesfregaço estar preparado deve executar-se a coloração de Wright-Giemsa, tratando-se do método recomendado para a realização das contagens celulares diferenciais de todos os fluídos biológicos (Ringsrud, Linné, 1995; Strasinger, Di Lorenzo, 2008a).

Numa infeção viral há predominância de células mononucleares (linfócitos e monócitos) e numa infeção de origem bacteriana predominam células polimorfonucleares (neutrófilos) (Ringsrud, Linné, 1995). Se se observarem outro tipo de células, como células tumorais ou anormais, estas também devem ser reportadas.

6.2. Líquido Sinovial

As articulações móveis encontram-se encapsuladas e o seu revestimento interno é a membrana sinovial sendo que o líquido sinovial se encontra no seu interior. A amostra de líquido sinovial colhe-se por artrocentese. O líquido sinovial é resultado da ultrafiltração do plasma dos capilares que irrigam a membrana sinovial e da secreção pelas células desta membrana, de um mucopolissacarídeo denominado ácido hialurónico que confere viscosidade ao líquido, tendo como função a lubrificação (Strasinger, Di Lorenzo, 2008b). A presença de ácido hialurónico dificulta a sua observação ao microscópio, e no caso do líquido estar muito viscoso pode-se realizar um pré-tratamento com hialuronidase (Ringsrud, Linné, 1995) ou pipetar com Pipeta Microman[®], adequada para pipetagem de líquidos voláteis, viscosos, densos ou com alta tensão superficial, como são exemplo o líquido sinovial e o sémen.

De acordo com o volume, cor, limpidez, viscosidade, quantidade total de leucócitos e de polimorfonucleares e a presença de cristais, podem-se dividir as patologias em não-inflamatórias, inflamatórias, infecciosas, hemorrágicas ou induzidas pela formação de cristais, embora possam existir várias situações em simultâneo (Strasinger, Di Lorenzo, 2008b).

Um dos mais importantes exames microscópicos de um líquido sinovial é a avaliação da presença e identificação de cristais. A deposição destes cristais denomina-se gota. A deposição de cristais mais frequente é de urato monossódico (vulgarmente conhecido como gota), podendo ainda ocorrer deposições de pirofosfato de cálcio di-hidratado (pseudo-gota), oxalato de cálcio e lípidos.

Estes cristais são identificados através das suas características de birrefringência, utilizando um microscópio de contraste de fase com um filtro de luz polarizada compensada. Os cristais de urato monossódico encontram-se sob a forma de agulhas muito birrefringentes e podem ser intracelulares ou extracelulares, tendo cor amarela quando o eixo do cristal se encontra paralelo ao eixo do compensador e azul quando está perpendicular - alongação negativa. Cristais de pirofosfato de cálcio têm forma romboide ou retangular, são fracamente birrefringentes tendo cor azul quando o eixo do cristal se encontra paralelo ao eixo do compensador e amarelo quando está perpendicular - alongação positiva (Figura 4).

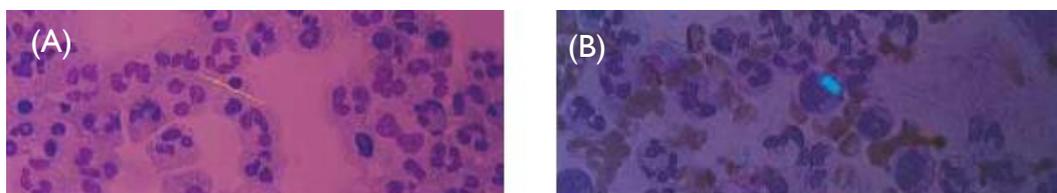


Figura 4. Cristais no líquido sinovial após coloração Wright-Giemsa e utilização de luz microscópio de contraste de fase com um filtro de luz polarizada compensada. **(A)** Cristais de urato monossódico encontram-se sob a forma de agulhas muito birrefringentes e podem ser intracelulares ou extracelulares, tendo cor amarela quando o eixo do cristal se encontra paralelo ao eixo do compensador e azul quando está perpendicular – alongação negativa. **(B)** Cristais de pirofosfato de cálcio têm forma romboide ou retangular são fracamente birrefringentes tendo cor azul quando o eixo do cristal se encontra paralelo ao eixo do compensador e amarelo quando está perpendicular – alongação positiva. [Fotos captadas no serviço de Patologia]

6.3. Flúido Pleural e Flúido Peritoneal

Os fluídos pleural e peritoneal fazem parte dos denominados fluídos serosos e preenchem o espaço potencial entre a membrana visceral e a membrana parietal, funcionando como lubrificante entre estas e os pulmões e a cavidade peritoneal, respetivamente (Ringsrud, Linné, 1995).

Os fluídos serosos são um ultrafiltrado de plasma e a sua constituição depende principalmente da pressão hidrostática sanguínea, pressão oncótica do plasma e permeabilidade capilar. Se, por exemplo, a pressão hidrostática aumentar, a pressão oncótica diminuir ou a permeabilidade capilar aumentar em resposta a infeção ou inflamação, há acumulação de líquido no espaço potencial, denominada efusão (Ringsrud, Linné, 1995). As efusões podem ser classificadas como transudatos ou exsudados. Os transudatos originam-se a partir do desequilíbrio entre as referidas pressões em consequência de diversas situações,

nomeadamente insuficiência cardíaca congestiva, cirrose hepática ou síndrome nefrótica, tendo um aspeto límpido, baixa contagem de leucócitos, eritrócitos e proteínas. Exsudados decorrem de uma situação mais localizada, que levam a danos nos capilares, nas membranas serosas ou diminuição da reabsorção pelo sistema linfático, nomeadamente infeções, inflamações, hemorragias e tumores e conseqüentemente são turvos, purulentos, hemáticos, com formação de coágulos, a contagem de leucócitos, eritrócitos e proteínas elevada, assim como a concentração de lactato desidrogenase (Mundt, Shanahan, 2011).

Os fluídos pleurais normais são claros e amarelo-pálido. Se o fluido se encontra turvo indica presença de leucócitos e um fluido hemático pode dever-se a hemotórax ou uma aspiração traumática. Os leucócitos encontrados com mais frequência no fluido pleural são os neutrófilos, linfócitos e eosinófilos, podendo encontrar-se também células mesoteliais ou com características de malignidade. A presença de neutrófilos é indicativa de infeção bacteriana, linfócitos podem dever-se a tuberculose, infeções virais, doenças autoimunes ou tumores (Strasinger, Di Lorenzo, 2008c). Células com características de malignidade apresentam núcleo e citoplasma anormais, nucléolos hiper cromáticos, aglomerados celulares e relação núcleo/citoplasma alterada (Figura 5).

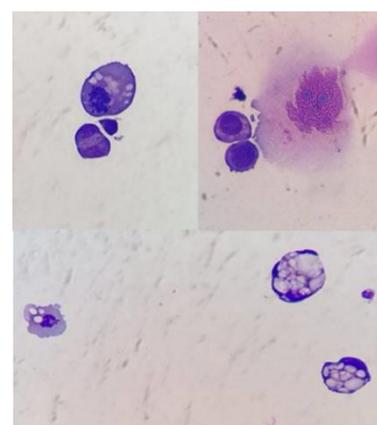


Figura 5. Células de fluido pleural com características de malignidade, grandes vacúolos citoplasmáticos, células em mitose. [Fotos captadas no serviço de Patologia Clínica.]

Uma efusão peritoneal é mais comumente denominada ascite. Os transudatos peritonias devem-se principalmente a cirrose hepática. O fluido peritoneal é amarelo pálido, podendo apresentar-se hemático, devido a punção traumática ou infeção, com cor verde a castanho, o que aponta para a presença de bÍlis e leitoso em conseqüência de má drenagem linfática. As principais células que se podem encontram no fluido ascítico são leucócitos, abundantes células mesoteliais e macrófagos (Mundt, Shanahan, 2011; Strasinger, Di Lorenzo, 2008c).

7. Espermograma

O sémen é constituído por espermatozoides diluídos em secreções fluídas dos órgãos sexuais acessórios, principalmente próstata e vesículas seminais, glândulas bulbouretrais e epidídimos. Para a realização da análise, a ejaculação é coletada para um recipiente estéril, os espermatozoides ficam aprisionados num coágulo formado por proteínas das vesículas seminais, sendo que este coágulo é liquefeito, devido a proteases com origem na próstata, num período entre 15 a 60 minutos. Numa liquefação completa a amostra torna-se mais homogénea e fluída com algumas zonas mais grumosas (WHO, 2010).

No sentido de permitir a completa liquefação da amostra, aguardam-se 20 minutos antes de medir a quantidade de amostra com uma pipeta graduada e de observar as suas características. Um sémen normal apresenta uma cor esbranquiçada, cheiro *sui-generis*, volume a partir de 1,5 mililitros e viscosidade tal que caia de gota em gota numa pipeta de deslocamento positivo. O pH é uma determinação importante já que influencia a motilidade e a viabilidade dos espermatozoides e deve encontrar-se num intervalo entre 7,2 e 8 (Ringsrud, Linné, 1995). Após o exame macroscópico fazem-se as determinações da motilidade, vitalidade, contagem total, e morfologia.

Para a avaliação da motilidade são pipetados 10 µl de amostra de sémen para uma lâmina e cobre-se com uma lamela de aresta 22 mm. Observa-se então ao microscópio e faz-se uma contagem dos espermatozoides com progressão rápida (regularidade e direção), progressão lenta (erráticos), não progressivos (*in situ*) ou imóveis. Pelo menos 200 espermatozoides devem ser contados e numa amostra normal pelo menos metade destes são móveis. Deve-se também avaliar a existência de agregados e caracterizar a sua formação, pois isto pode indicar uma causa imunológica para a infertilidade.

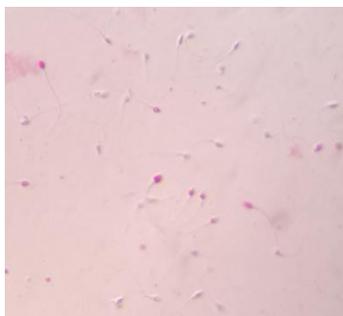


Figura 6. Espermatozoides com coloração de eosina: com membrana destruída coram de rosa, encontrando-se mortos e não viáveis; com membrana intacta, não são corados. [Foto captada no Serviço de Patologia.]

A contagem total realiza-se em Hemocítmetro Neubauer, em duas câmaras, e deve-se contar, pelo menos, 200 espermatozoides em cada uma, contabilizando apenas os espermatozoides completos, ou, caso existam duas cabeças ou duas caudas, apenas se contabiliza um espermatozoide.

O estudo da vitalidade espermática requer o uso de uma solução de eosina, que vai corar os espermatozoides com membrana destruída e que por isso se encontram mortos e não viáveis, em contrapartida células com membrana intacta não são coradas (Figura 6). Esta técnica permite validar a avaliação da motilidade, uma vez que o número de espermatozoides mortos não deve ultrapassar o número de espermatozoides imóveis permitindo ainda distinguir células imóveis de não viáveis (WHO, 2010).

A avaliação das características morfológicas dos espermatozoides realiza-se após coloração de Papanicolau ao esfregaço de sémen (Figura 7). O espermatozoide pode ser dividido em cabeça, colo, peça intermédia e cauda. A coloração de Papanicolau permite corar o acrossoma e o núcleo da cabeça, o excesso de citoplasma residual, a peça intermédia e a peça principal, células germinativas imaturas e células não espermáticas, tais como leucócitos (WHO, 2010). Segundo as linhas orientadoras da WHO (2010), a cabeça deve ser lisa e oval e o acrossoma deve ocupar menos de 70% e ter menos de dois vacúolos, o colo deve ser

delgado e ter o tamanho da cabeça sendo alinhado com esta e a cauda deve ter um calibre

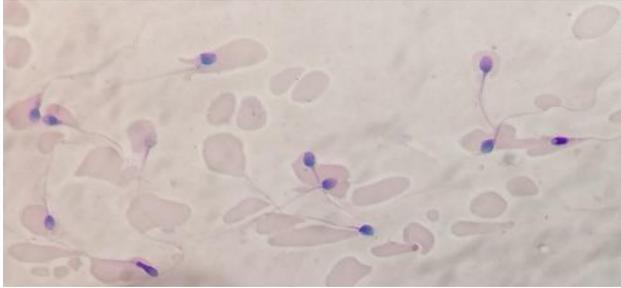


Figura 7. Esfregaço de sémen corado por Papanicolaou. Consegue visualizar-se cabeça, a peça intermédia e a peça principal dos espermatozoides. [Foto captada no Serviço de Patologia.]

uniforme e ser dez vezes o comprimento da cabeça. É também preciso contabilizar leucócitos e células germinativas diferenciando-os, já que estas apresentam uma coloração rosa e leucócitos polimorfonucleares possuem uma cor mais azulada.

MICROBIOLOGIA

A microbiologia clínica estuda a prevenção, o diagnóstico e o tratamento de doenças infecciosas que podem ser causadas por vírus, bactérias, fungos ou parasitas. Nesta secção do serviço de Patologia Clínica da ULSAM realizam-se diversas análises a urinas, fezes, secreções e lavados brônquicos, lavados broncoalveolares, hemoculturas, líquidos estéreis, exsudados purulentos, auriculares, oculares, cervico-vaginais e cateteres, de forma a fazer a identificação do(s) agente(s) infeccioso(s) envolvido(s) numa dada patologia e a determinação da suscetibilidade deste(s) agente(s) a antibióticos ou antifúngicos quando aplicável.

Neste sector, aquando do meu estágio, faziam parte da equipa de trabalho duas TSS, um Médico Patologista e cinco TSDT. As TSDT têm como funções a triagem e sementeira das amostras, realização dos testes imunocromatográficos, coloração das lâminas, repicagens e incubação nos painéis para o processamento da identificação e o antibiograma dos microrganismos, assim como a limpeza da câmara de fluxo laminar tipo II e organização do espaço de trabalho e manutenção dos equipamentos. As funções principais das TSS englobam a observação das placas de cultura, valorização dos possíveis microrganismos, observação das lâminas coradas e a fresco, assim como a validação de todos os resultados.

O Controlo de Qualidade Interno realiza-se semanalmente com estirpes de referência ATCC de *Escherichia coli* (*E. coli*), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) e *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), sendo que os respetivos discos têm de ser incubados em Caldo de Tioglicolato para posteriormente se proceder à inoculação e incubação para posterior identificação e suscetibilidade aos antibióticos. O setor de Microbiologia participa também no programa de Controlo de Qualidade Externo NEQAS para bacteriologia mensalmente, micobacteriologia realiza-se de seis em seis meses e parasitologia de dois em dois meses.

Durante o estágio nesta valência tive a oportunidade de integrar a equipa de trabalho, tendo a oportunidade de realizar diversos trabalhos laboratoriais, nomeadamente semear produtos biológicos, executar diversos testes imunocromatográficos, assim como assistir e participar na valorização e identificação dos diversos microrganismos a partir de testes bioquímicos, painéis de identificação e galerias e, ainda, observar colorações de Gram, *Kinyoun* e Auramina.

I. Colheita e transporte das amostras

A colheita e o transporte de amostras são de extrema importância, dado que os resultados são diretamente influenciados pela sua qualidade, devendo ser tomadas todas as precauções de forma a excluir ou minimizar os microrganismos contaminantes que podem

interferir no crescimento do agente patogénico (Tille, 2017). Todos os produtos devem ser colhidos para um tubo ou frasco apropriados e estéreis. No Anexo I encontram-se descritos os procedimentos para colheita e transporte das diversas amostras que chegam ao laboratório de Patologia Clínica, à secção de Microbiologia.

2. Exame bacteriológico

Após a receção das amostras, deve confirmar-se a identificação com a requisição para depois realizar o seu processamento. O exame bacteriológico inicia-se não só com a sementeira primária em diferentes meios de cultura (Anexo 2), em câmara de fluxo laminar tipo II, tendo em conta o tipo de amostra e o tipo de colheita a que esta foi sujeita, como também com a realização de um esfregaço numa lâmina para posterior coloração, exceto no caso de cateteres e fezes. Existe um protocolo de sementeira afixado, no sentido da uniformização e diminuição dos erros cometidos (Tabela 6). Todos os dias se realiza uma placa de controlo da câmara de fluxo laminar, para verificar a sua assepsia.

Tabela 6 - Meios de cultura e técnicas de sementeira utilizados para as diferentes amostras.

Amostra	Meios de Cultura	Técnica
Urina	CLED	Técnica da ansa calibrada
Fezes	MCK, Hektoen, SS e caldo para Gram-Negativos (GN-após 24h incubação é inoculado nos meios Hektoen e SS)	Técnica do esgotamento do produto por extensão à superfície do meio sólido
Amostras do trato respiratório superior / inferior	MCK, COS e PVX	Técnica do esgotamento do produto por extensão à superfície do meio sólido
Hemoculturas positivas / imunodeprimidos	PVX e SCS (anaeróbios)	Técnica do esgotamento do produto por extensão à superfície do meio sólido
Cateter vascular	PVX	Técnica de Maki (rolamento)
LCR	COS e PVX, caldo BHI (prova de esterilidade BHI)	Técnica da concentração (3 gotas)
Outrs fluidos em frasco	MCK, COS, PVX e caldo TG	Técnica do esgotamento do produto por extensão à superfície do meio sólido
Exsudados em zaragatoa	MCK, COS e PVX	Técnica do esgotamento do produto por extensão à superfície do meio sólido
Exsudado / líquidos em seringa	MCK, COS, PVX, caldo TG e caldo Schaedler	Técnica do esgotamento do produto por extensão à superfície do meio sólido
Exsudado cervico-vaginal / uretral e esperma	COS, PVX, Gardnerella, VCAT, SGC	Técnica do esgotamento do produto por extensão à superfície do meio sólido

2.1. Exame bacteriológico em diferentes amostras biológicas

A seguir, seguindo a ordem das amostras indicada na Tabela 6, são abordados os principais organismos subjacentes à maioria das infecções, o exame bacteriológico e a sua interpretação.

2.1.1. Urina

As infecções do trato urinário (ITU) são muito frequentes e levam os doentes a recorrer a cuidados de saúde primários ou de urgência, perfazendo as amostras de urina a maior parte das amostras que dão entrada no laboratório de microbiologia clínica.

Os microrganismos responsáveis por estas infecções são, na sua generalidade, bactérias, originárias da uretra distal ou de origem entérica, sendo esta via denominada ascendente. Devido à uretra feminina ser relativamente curta e ficar mais próxima do períneo as ITU são mais frequentes em mulheres. Os Bacilos Gram-negativos são responsáveis pela maioria destas infecções, mais especificamente *E. coli* uropatogénica, *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) associado a pacientes mais velhos, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) e *P. aeruginosa* em utentes internados. Entre os Cocos Gram-positivos, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus saprophyticus* (*S. saprophyticus*) e *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) são os principais agentes etiológicos. *S. saprophyticus* é a espécie mais comum de estafilococos coagulase-negativos em adolescentes e mulheres jovens sexualmente ativas e *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) em grávidas (McCarter, Burd, Hall, Zervos, 2009).

Bactérias podem ainda causar infeção por via hematológica ou linfática, em consequência do aumento da pressão na bexiga. A invasão por via hematológica é resultado de bacteriémia sendo normalmente *S. aureus*, *Salmonella spp.*, *Leptospira spp* e a levedura *Candida albicans* os agentes etiológicos principais (Tille, 2017; McCarter et al., 2009).

Para a interpretação do resultado da cultura de urina, deve ter-se em atenção se o utente tem sintomas de infeção, os resultados do sedimento urinário (em particular se tem piúria), a idade e sexo, assim como o estado de gravidez, o tipo de colheita efetuada ou a toma de antibióticos. O número de colónias isoladas relaciona-se com o número de bactérias, sendo que 1 colónia representa 10^3 unidades formadoras de colónias (UFC)/ml, 10 colónias representam 10^4 UFC/ml e 100 representam 10^5 UFC/ml. 10^5 UFC/ml geralmente implica infeção, embora vários estudos apontem para que uma contagem entre 10^3 e 10^4 UCF também possam implicar uma ITU (McCarter et al., 2009). Em amostras obtidas por punção supra-púbica, todas as colónias se devem valorizar, excluindo os comensais da pele (Fonseca et al., 2004). Se apenas se encontrar um ou dois tipos de colónias, o resultado deve ser reportado relativamente a UFC, com identificação e antibiograma. Após observação ao microscópio e

observação das placas (colónias mais pequenas e compactas são indicativas de bactérias gram-positivas, enquanto que colónias com maior volume normalmente correspondem a Gram-negativas), pode fazer-se a repicagem para isolamento quando há um predomínio claro de um tipo de colónia. Mais de três tipos de colónias sem nenhum predomínio indica contaminação e deve-se pedir uma nova amostra.

A lâmina com coloração por Gram é analisada ao microscópio com óleo de imersão na objetiva de 100X. Um número superior a 10 piócitos (leucócitos) por campo indica piúria, embora a coloração de Gram não seja uma coloração primária para a morfologia celular, a presença de muitas células epiteliais escamosas e várias morfologias bacterianas sugere contaminação.

Ao setor de Microbiologia, para além das uroculturas, são também requisitados a pesquisa de *Leptospira* spp., de Polissacarídeos Capsulares de *S. pneumoniae* antígenos lipopolissacarídicos de *Legionella pneumophila* serogrupo.

2.1.1.1. Pesquisa de *Leptospira* spp. em amostras de urina

As leptospiras são espiroquetas finas e enroladas com extremidades em forma de gancho, são móveis graças a dois flagelos periplasmáticos e aeróbios obrigatórios com crescimento ótimo entre 28°C a 30°C. *Leptospira interrogans* é a principal espécie associada à leptospirose humana. A leptospirose possui várias manifestações clínicas e deve ser considerada em pacientes com possível exposição ocupacional ou recreativa ou após inundações, principalmente em países em vias de desenvolvimento (McCarter *et al.*, 2009; Murray *et al.*, 2016).

As amostras de urina devem ser colhidas a partir da segunda semana da doença e até 30 dias após o início dos sintomas. Estas não devem ser colocadas em conservantes, devem ser transportadas a temperatura ambiente e processadas dentro de 1 hora após colheita para aumentar as probabilidades de sobrevivência da *Leptospira* spp.

A urina deve ser rapidamente inoculada, devido à sua acidez, que prejudica a viabilidade e o crescimento da bactéria. Uma ou duas gotas de urina são adicionadas ao meio de *Fletcher* e realiza-se uma diluição de 1:10 para outro tubo com o mesmo meio. Ambos os meios são incubados à temperatura ambiente, no escuro, até 6 semanas. Uma vez que são aeróbios estritos, crescem logo abaixo da superfície, formando um anel cinza (anel de *Dinger*). Deve colher-se uma gota do anel todas as semanas, para avaliar se há ou não presença de *Leptospira* (Tille, 2017).

Visto que são espiroquetas muito finas, não são detetadas em microscópio ótico, nem coradas pela coloração de Gram. A urina deve então ser observada diretamente por

microscopia de campo escuro após centrifugação a 3500 rpm durante 30 minutos procurando-se as espiroquetas através de “movimentos em saca-rolhas”, embora esta metodologia também seja relativamente insensível, levando a descobertas inespecíficas (Murray *et al.*, 2016).

2.1.1.2. Detecção de antígenos lipopolissacarídicos de *Legionella pneumophila* serogrupo I em amostras de urina

Legionella spp. são bactérias Gram-negativas, finas, pleomórficas, com forma de cocobacilos curtos quando observados nos tecidos. As infecções sintomáticas são principalmente causadas por *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*), sendo que os serotipos I e 6 são mais comumente isolados. Afetam principalmente os pulmões e podem causar uma doença semelhante à gripe (febre de Pontiac) ou uma forma grave de pneumonia (Doença do Legionário). Um teste de imunocromatografia é usado para detetar antígenos lipopolissacarídicos solúveis específicos para *L. pneumophila* do serogrupo I excretados na urina. A sensibilidade destes ensaios para *L. pneumophila* do serogrupo I é relativamente alta, particularmente com urina concentrada, mas os ensaios não detetam com fiabilidade outros serogrupos ou espécies de *Legionella* (Murray *et al.*, 2016).

2.1.1.3. Detecção de Polissacarídeos Capsulares de *Streptococcus pneumoniae* em amostras de urina

S. pneumoniae é uma bactéria Gram-positiva cujas espécies virulentas possuem uma cápsula constituída por polissacarídeos. É o agente mais comum de pneumonia adquirida na comunidade, resultando na hospitalização principalmente de crianças, idosos e adultos imunodeprimidos, podendo também levar a meningite em consequência de bacteriemia, sinusites, otites ou traumatismos crânio-encefálicos. Bacteriemia em consequência de pneumonia ocorre em 25% a 30% dos pacientes (Murray *et al.*, 2016). Os polissacarídeos de *S. pneumoniae* são excretados na urina e podem ser detetados a partir de um teste imunocromatográfico. A sensibilidade deste foi relatada como sendo de 70% em pacientes com pneumonia pneumocócica bacteriémica, embora, a especificidade pode ser baixa, particularmente em crianças. Por esse motivo, associa-se outras análises, tais como hemoculturas (Murray *et al.*, 2016).

2.1.2. Fezes

As infecções gastrointestinais encontram-se difundidas mundialmente e afetam principalmente crianças e idosos, embora afetem também outras faixas etárias devido a uma maior mobilidade entre países e ao aumento do número de pessoas imunocomprometidas. A

maior parte das infecções gastrointestinais é de origem bacteriana ou vírica e autolimitada, não necessitando de antibioterapia ou coprocultura. A realização de cultura de fezes é apenas indicada para utentes com diarreia grave ou prolongada, sintomas consistentes com doença invasiva ou antecedentes (Humphries, Linscott, 2015).

A via de transmissão mais comum é a fecal-oral e os microrganismos podem provocar infeção através da alteração do equilíbrio de água e eletrólitos no intestino delgado, normalmente pela produção de enterotoxinas, o que leva a uma excreção acentuada dos fluídos. Este é um processo não inflamatório e os principais agentes responsáveis por este tipo de infeção são *Vibrio cholerae*, *E. coli* enterotoxigénica, *Bacillus cereus*, Rotavírus e Adenovírus (principalmente em crianças) e Norovírus (Tille, 2017).

Shigella spp., *E. coli* Enteroinvasiva, *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*, *Campylobacter coli* e o parasita *Entamoeba histolytica* causam a destruição celular ou uma resposta inflamatória exacerbada, levando a disenteria, diarreia com muco, sangue e leucócitos (Tille, 2017).

Outro mecanismo que leva a infeção é a penetração da mucosa intestinal pelo agente infeccioso, disseminação e multiplicação nas células linfáticas ou reticuloendoteliais fora do intestino, podendo ocorrer infeções sistémicas, provocadas por *Salmonella enterica* serotipo Typhi, *Yersinia enterocolitica* (Tille, 2017).

Previamente à análise bacteriológica das fezes deve-se examinar para avaliar a presença de sangue e muco, pois neste meio vai-se encontrar um maior número de patógenos (Humphries, Linscott, 2015). Caso o utente seja imunocomprometido, uma criança ou as fezes apresentem sangue deve também inocular-se em meio *Campylobacter*, meio seletivo que permite isolar *Campylobacter spp.* e este deve ser incubado em atmosfera microaerofílica e 42°C para otimizar a recuperação e evitar o crescimento excessivo de outros microrganismos entéricos (Humphries, Linscott, 2015).

Após os tempos de incubação estabelecidos, os meios MCK, Hektoen, e SS são examinados e procuram-se colónias com características de patógenos entéricos. Nos meios MCK e SS deve haver crescimento de não fermentadores da lactose (colónias incolores) com ou sem produção de H₂S (centro negro). Em meio Hektoen as colónias deverão ser verdes a verde-azulado, com ou sem centro negro. Caso sejam encontradas estas colónias típicas procede-se à sua identificação e realiza-se o antibiograma.

Para além da análise bacteriológica referenciada dirigida à deteção de Enterobactérias, referem-se ainda, pela sua relevância, as seguintes determinações nas fezes: deteção de antigénio e toxinas A e B de *Clostridium difficile* e Pesquisa de Carbapenemases.

2.1.2.1. Detecção do antígeno e das toxinas A e B de *Clostridium difficile* (*C. difficile*) em amostras de fezes

C. difficile é um bacilo Gram-positivo, anaeróbico obrigatório e formador de esporos, resistentes à acidez do estômago, ao calor e a muitos desinfetantes usados em hospitais. Para além disso é produtor de duas toxinas, toxina A, uma enterotoxina e toxina B, uma citotoxina (Humphries, Linscott, 2015). A infeção desenvolve-se quer em utentes sob antibioterapia, uma vez que estas podem alterar a microbiota e proporcionar o crescimento de *C. difficile* quer sujeitos a internamento prolongado. *C. difficile* pode causar diarreia leve a moderada ou colite pseudomembranosa (Murray *et al.*, 2016). O antígeno glutamato desidrogenase, produzido em grandes quantidades por todas as estipes e as toxinas A e B podem ser detetados em amostras de fezes através de um teste imunocromatográfico. Este teste permite avaliar a presença ou não de *C. difficile* e se esta é ou não toxigénica. Para além de requisitado pelo clínico, nas amostras de fezes em que não se desenvolve crescimento em nenhum dos meios de sementeira, também se procede à pesquisa do antígeno e toxinas A e B de *C. difficile*.

2.1.2.2. Pesquisa de Carbapenemase em zaragoas retais

Nos últimos anos, a resistência aos carbapenemos, antibióticos β -lactâmicos usados para tratar um largo espectro de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, tornou-se generalizada. As Enterobacterias Resistentes aos Carbapenemos possuem dois mecanismos de resistência relacionados com a produção quer de uma betalactamase quer de carbapenemases, estas últimas enzimas capazes de hidrolisar os carbapenemos. A Carbapenemase de *Klebsiella pneumoniae* (KPC) é a principal em Portugal e a que possui maior transmissibilidade, através de plasmídeo, para as restantes bactérias. Para além desta, existem outras, designadamente Nova Deli Metallo-betalactamase (NDM), Verona Integron-encoded Metallo-betalactamase (VIM), Oxacilinase tipo 48 (Oxa-48) e Imipenemase Metallo betalactamase (IMP) (PPCIRA, 2017). Assim, para utentes que vão ser internados é importante realizar uma pesquisa por zaragatoa retal, para deteção por biologia molecular (PCR em tempo real). O teste Xpert Carba-R deteta as principais famílias de genes das carbapenemases.

2.1.3. Trato Respiratório Superior (Exsudados nasais)

O aparelho respiratório superior inclui os seios nasais, faringe (dividida em nasofaringe, orofaringe e laringofaringe), cavidade nasal, epiglote e laringe. A maioria das infeções neste sistema é autolimitada e de origem viral (Tille, 2017). O trato respiratório é colonizado por vários microrganismos, alguns potencialmente patogénicos, tais como o *S. pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*), *S. aureus* (MRSA p.e.), *Haemophilus influenzae* (*H.*

influenzae), *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*), leveduras como *Candida* spp. e família *Enterobacteriaceae* bem como *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis* e *Moraxella catarrhalis* (Vandepitte et al., 2003; Tille, 2017). O diagnóstico bacteriológico torna-se complicado devido à microbiota habitual de bactérias aeróbias e anaeróbias, sendo importante distinguir entre os comensais e os patógenos (Vandepitte et al., 2003).

Para além do exame bacteriológico aos exsudados nasais, realiza-se ainda a pesquisa de Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) em zaragatoas nasais.

2.1.3.1. Pesquisa de Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) em zaragatoas nasais

S. aureus é uma bactéria Gram-Positiva que coloniza as narinas (reservatório primário) e a pele de indivíduos saudáveis. A resistência bacteriana à meticilina é mediada pela aquisição de um gene (*mecA*) que codifica uma proteína que não se liga à meticilina ou a outros antibióticos β -lactâmicos. Infecções por *S. aureus* são frequentemente associadas não só a cuidados de saúde hospitalares aumentando a morbidade e mortalidade de infecções nosocomiais, como também adquiridas na comunidade (DGS, 2015). Por isto, é importante a identificação por biologia molecular (*Xpert* MRSA- PCR em tempo real) e proceder-se à descolonização dos utentes portadores.

2.1.4. Amostras de Trato Respiratório Inferior

As Infecções do trato respiratório inferior ocorrem na traqueia, nos brônquios, bronquíolos e alvéolos, originando bronquites, bronquiolites e pneumonias. Estas infecções podem ser por colonização ou infecção das vias aéreas superiores que se estende posteriormente para o pulmão, por aspiração, por inalação de gotículas infecciosas ou por via sanguínea.

Bordetella pertussis está frequentemente associada a bronquite em bebês e crianças. A pneumonia, caracterizada pela inflamação e acumulação de líquido nos alvéolos e estruturas de suporte, é uma das principais causas de morbidade e mortalidade, podendo ter como origem a comunidade ou serem infecções nosocomiais (Tille, 2017). As bactérias mais frequentemente responsáveis pela pneumonia adquirida na comunidade incluem *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* e *Legionella* spp. As pneumonias nosocomiais estão associadas a ventilação mecânica, crianças ou idosos, doença subjacente grave, imunodepressão, doença cardiopulmonar, pós-operatório de cirurgia abdominal e são principalmente devido a MRSA, *P. aeruginosa*, bactérias da família *Enterobacteriaceae* e *Acinetobacter* spp (Sharp et al., 2004; Tille, 2017).

As amostras que são recebidas no laboratório incluem lavados brônquicos e broncoalveolares e expectoração. A preparação do esfregaço de expectoração é primordial para o prosseguimento para exame cultural. O esfregaço deve ser preparado a partir de partes mais mucopurulentas da amostra (Sharp *et al.*, 2004). Uma amostra própria para cultura tem menos de 10 células epiteliais por campo (objetiva 10X) e embora o número de leucócitos possa não ser relevante, uma vez que muitos utentes podem encontrar-se neutropênicos, a presença de 25 ou mais neutrófilos associado a menos de 10 células epiteliais indica uma amostra própria. A presença de bactérias e fungos deve também ser reportado. Amostras com mais de 25 células epiteliais por campo devem ser consideradas impróprias e pedir uma nova amostra corretamente colhida. Para a deteção de *Legionella* spp., a expectoração pode ser escassa e aguada, por isso não deve ser submetida a esta avaliação (Tille, 2017).

Após o tempo de incubação, as placas são avaliadas e se possuírem mais de 2 tipos diferentes de colónias é considerada contaminação e pedida nova amostra. Menos de 2 tipos de colónias têm de ser isolados para se proceder a identificação e antibiograma.

2.1.5. Sangue

A invasão da corrente sanguínea por microrganismos constitui uma das situações mais graves das doenças infecciosas e é denominada bacteriémia, no caso das bactérias.

As infeções podem ter origem intravascular, a partir de endocardite ou cateteres intravenosos; ou origem extravascular, pela entrada de bactérias na circulação sanguínea provenientes de outro local de infeção (Tille, 2017; Baron *et al.*, 2005).

As principais causas de endocardite são os *Streptococcus* do grupo viridans, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus mutans* e grupo de Bacilos Gram-negativos fastidiosos, HAECK (*Haemophilus aphrophilus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Cardiobacterium hominis*, e *Kingella kingae*). A maioria destas infeções são causadas pelo uso de cateteres intravasculares. *Streptococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) e outros estafilococos coagulase-negativo assim como *S. aureus*, capazes de formar um biofilme, são as principais causas.

Os organismos mais comumente isolados do sangue de origem extravascular incluem microrganismos do ambiente hospitalar e que colonizam a pele, a orofaringe e o trato gastrointestinal dos doentes, tais como bactérias da família *Enterobacteriaceae*, assim como *Pseudomonas* spp., *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*) e *N. meningitidis*, *H. influenzae* e cocos anaeróbicos, *Bacteroides* e *Clostridium* spp (Tille, 2017).

As hemoculturas são o método de diagnóstico de infeção da corrente sanguínea, a partir do qual se faz a identificação e o antibiograma do agente patogénico. A recuperação de

microrganismos verdadeiramente patogénicos do sangue depende de muitos fatores, particularmente do grau de bacteriemia, do método de colheita, que inclui o momento, o volume de sangue e o número das hemoculturas. As hemoculturas são requisitadas pelo clínico quando o paciente tem febre, leucocitose, choque séptico, suspeita de endocardite ou antes de começar antibioterapia a pacientes idosos ou imunodeprimidos (Lamy *et al.*, 2016).

Idealmente, as amostras de sangue para hemoculturas devem ser colhidas antes de um pico de febre pois é nesta altura que a bacteriemia atinge o seu máximo, mas não se pode determinar quando isso vai ocorrer. De facto, o sangue deve ser colhido após o início da febre, no entanto, o grau de bacteriemia pode ser menor devido a esta e sendo assim, as hemoculturas devem ser colhidas quando o paciente sente calafrios ou o mais cedo possível após o início da febre (Baron *et al.*, 2005).

A colheita de sangue para hemocultura faz-se por punção venosa periférica, sendo que a desinfeção da pele é de extrema importância para evitar a contaminação com a microbiota da pele, como os estafilococos coagulase-negativos ou *Corynebacterium* spp., pois estes podem também ser potenciais patógenos (Baron *et al.*, 2005).

No sentido de aumentar a probabilidade de recuperação do patógeno e para a interpretação de uma hemocultura positiva, é recomendado a colheita de mais de uma hemocultura, dependendo da situação clínica (Tille, 2017). Normalmente são colhidas 2 hemoculturas em locais diferentes para recuperação de aeróbios e uma para anaeróbios.

Depois de receber as hemoculturas, de confirmar o número e o nome do doente, estas são incubadas no BD BACTEC™ 9240. Os frascos, com meio líquido de Soja-Caseína digerida, para além de conterem resinas que permitem a neutralização de antibióticos, contêm um sensor colorimétrico no fundo de cada garrafa permeável ao CO₂. Se existir crescimento microbiano, há aumento de CO₂ que se difunde através da membrana e leva a uma alteração de cor que é detetada por um sensor no sistema. A agitação dos frascos promove o crescimento da maioria das bactérias aeróbicas (Tille, 2017).

As hemoculturas são incubadas a 35°C durante 5 dias, a não ser que haja suspeita de HAECK ou outros fastidiosos e durante 14 dias para deteção de fungos.

Diferenciar contaminantes de verdadeiros agentes patogénicos é difícil, especialmente porque a mesma espécie pode ser contaminante ou patogénica. Crescimento de *Bacillus* spp. (que não *Bacillus anthracis*) *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium*; estafilococos coagulase-negativos apenas numa das culturas ou crescimento polimicrobiano podem ser considerados contaminantes. No entanto, se só houver um frasco de hemocultura positiva tem de se reportar esse facto, assim como se o utente for imunodeprimido (Tille, 2017). Após a valorização das culturas deve proceder-se à sua identificação e antibiograma.

2.1.6. Cateter vascular

Os cateteres são as principais fontes de infecção da corrente sanguínea, mesmo quando há desinfecção do local tanto na sua inserção como na sua manutenção. Estes são propensos a ser colonizados pela microbiota da pele ou por agentes patogénicos primários (Baron *et al.*, 2005). Assim, após a retirada do cateter (Anexo I) e o seu envio para o laboratório, a técnica usada para diagnosticar uma infecção relacionada com cateter quantifica o crescimento bacteriano, seguindo a técnica de Maki (Tille, 2017).

Após a incubação, o número de colónias é contado. A valorização faz-se a partir de 15 colónias em circunstâncias normais, embora em alguns casos possa ser reduzido a 5 com vista a aumentar a sensibilidade (Baron *et al.*, 2005). Deve também ter-se em atenção o resultado das hemoculturas, se for o caso.

2.1.7. Líquido cefalorraquidiano

As infeções do sistema nervoso central, em particular meningites, infeções no espaço subaracnoide, na pia-máter ou na membrana aracnoide, são uma emergência médica e devem ser tratadas com celeridade (Tille, 2017).

Dependendo da idade do doente, existem agentes patológicos mais prováveis de causar meningite. Os recém-nascidos devido ao sistema imunológico imaturo, à barreira hematoencefálica mais permeável e ao contacto com a microbiota do trato vaginal no parto são mais suscetíveis ao seu desenvolvimento, nomeadamente por *S. agalactiae*, *E.coli* ou outros bacilos gram-negativos e *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*).

Em crianças, *H. influenzae* é uma causa comum de meningite assim como nos idosos, bem como *S. pneumoniae*, que muitas vezes se desenvolve a partir de uma infeção dos seios nasais ou do ouvido médio. Nos adultos jovens, *N. meningitidis* é, frequentemente, o agente etiológico para além de *S. pneumoniae*, *L. monocytogenes* e, menos comumente, *S. aureus* e bacilos gram-negativos como *E. coli*, *Klebsiella spp.*, e *P.aeruginosa* (Tille, 2017; Vandepitte *et al.*, 2003).

Após a receção do tubo de uma amostra de LCR deve analisar-se o seu aspeto que pode ser límpido, turvo, purulento, amarelado (devido a hemólise ou icterícia) ou hemático, por exemplo. No exame microscópico da lâmina corada por Gram deve-se analisar toda a gota na lâmina, procurando bactérias características, por exemplo diplococos Gram-negativos intracelulares característicos de *N. meningitidis*, diplococos Gram-positivos com halo à volta característica de cápsula polisacarídica de algumas estirpes de *S. pneumoniae* ou cocobacilos Gram-negativos, sugestivos de *H. influenzae*.

Para além do exame cultural bacteriológico realiza-se ainda a pesquisa de antígenos solúveis (PAS) de *S. pneumoniae*; *H. influenzae* de tipo b; *N. meningitidis* do grupo A, C, Y e W135; *E. coli* K1 e *Streptococcus* do grupo B.

2.1.7.1. Pesquisa de antígenos solúveis (PAS) em amostras de LCR

Devido à gravidade da meningite bacteriana, um diagnóstico rápido é importante para o início da terapêutica. Os exames diretos culturais são demorados e, por isso, a pesquisa de antígenos bacterianos solúveis nos líquidos biológicos, nomeadamente no LCR, permite um diagnóstico mais célere, embora não substitua a análise cultural. Os antígenos solúveis detetados neste teste são referentes a *S. pneumoniae*; *H. influenzae* de tipo b; *N. meningitidis* do grupo A, C, Y e W135; *E. coli* K1 e *Streptococcus* do grupo B. O teste usa o princípio de uma partícula revestida de anticorpo capaz de se ligar ao antígeno específico, resultando em aglutinação visível macroscopicamente, se este se encontrar presente no LCR.

2.1.8. Fluído pleural, fluído peritoneal e fluído sinovial

Estes líquidos orgânicos são estéreis, por isso, o isolamento de uma colónia indica um potencial agente patogénico.

Um aumento da quantidade de líquido pleural purulento é designado empiema, complicação comum da pneumonia ou de infeções subdiafragmáticas. Os microrganismos responsáveis por estas infeções vão-se acumular e podem ser isolados a partir desta amostra. Os principais isolados em indivíduos imunocompetentes são *S. aureus*, *Streptococcus* β-hemolíticos e anaeróbios facultativos e em indivíduos imunodeprimidos são *P. aeruginosa* e família *Enterobacteriaceae* (Monteiro et al., 2011).

A peritonite resulta da inflamação da membrana peritoneal. A peritonite primária é rara e ocorre quando uma infeção se dissemina. Os agentes etiológicos mais comuns nas crianças são *S. pneumoniae* e estreptococos do grupo A, família *Enterobacteriaceae*, outros Bacilos Gram-negativos e estafilococos. Nos adultos, os principais agentes são *E. coli*, *S. pneumoniae* e estreptococos do grupo A e nas mulheres jovens sexualmente ativas, *N. gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*). A peritonite secundária surge a partir da perfuração de um órgão, lesão traumática ou perda da integridade da parede intestinal e as bactérias mais frequentemente isoladas são *E. coli* e anaeróbios, tais como *Bacteroides fragilis*, *Bilophila* spp. e *Clostridium* spp. (Tille, 2017).

A inflamação das articulações de origem microbiológica, artrite infecciosa, geralmente é um processo secundário à disseminação de bactérias pelo sangue ou, menos frequentemente, fungos, podendo também ocorrer após a injeção de corticosteroides ou após a inserção de

material prostético. *S. aureus* é o agente etiológico mais comum, mas podem também ser isolados *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *Streptococcus spp.*, assim como bactérias anaeróbicas, *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium necrophorum* (Tille, 2017).

2.1.9. Exsudados purulentos derivados de feridas

Alguns exsudado podem ter origem em feridas, abscessos ou fístulas, por exemplo, sendo ricos em leucócitos, microrganismos e fibrina. Os agentes etiológicos variam com o local e o tipo de infecção. *S. aureus* é o agente etiológico mais comum para abscessos localizados nos folículos capilares, assim como a família *Enterobacteriaceae* (Vandepitte et al, 2003). *Aeromonas spp.*, *Enterococcus spp.*, *Streptococcus* β - hemolíticos e do grupo viridans são alguns dos exemplos de bactérias presentes em feridas ou queimaduras.

Nestas amostras devem valorizar-se Bacilos Gram-negativos, *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus spp.* Os comensais da pele devem valorizar-se em frasco e seringa porque se pressupõe que a colheita foi feita de forma asséptica. Em seringa, valorizam-se ainda os anaeróbios. Após valorização das colónias procede-se a identificação e antibiograma.

2.1.10. Exsudados oculares e auriculares

A microbiota ocular está presente no saco conjuntival sendo que *S. epidermidis*, *Lactobacillus spp.* e *Propionibacterium acnes* são os microrganismos mais comuns, mas esta composição é variável entre indivíduos. Entre outros fatores deve ter-se em conta a idade e o estado imunitário do utente, pois, os recém-nascidos, por exemplo, são mais propensos a desenvolver conjuntivite devido a *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *S. aureus* e Bacilos Gram-negativo (Tille, 2017).

As infeções auriculares dividem-se em otites médias e otites externas. As otites médias são muito vulgares em bebés e crianças pois a trompa de Eustáquio é mais curta e mais propensa a infeção de *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *Moraxella catarrhalis*. Uma otite externa é uma infeção semelhante à da pele ou tecidos moles. E é causada principalmente por *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* e outros Bacilos Gram-Negativos (Tille, 2017). Após incubação das placas, faz-se a valorização das colónias seguida de identificação dos agentes patogénicos e antibiograma.

2.1.11. Exsudado cervico-vaginal e uretral

Várias espécies de bactérias colonizam a zona genital feminina e masculina, constituindo assim uma barreira biológica que impede a aderência de patógenos e normalmente não causam doença, exceto em circunstâncias anormais, nomeadamente quando uma espécie está em

predomínio. A microbiota uretral normal inclui estafilococos coagulase-negativos, corinebactérias e anaeróbios. A vulva e o pênis (especialmente a área sob o prepúcio de homens não circuncidados) podem ser colonizados com bactérias gram-positivas e *Mycobacterium smegmatis* (Tille, 2017).

A microbiota do trato genital feminino varia com a idade e com o pH. Pré-adolescentes e mulheres em pós-menopausa são colonizadas principalmente por estafilococos e corinebactérias. Mulheres em idade reprodutiva têm uma microbiota constituída maioritariamente por lactobacilos seguido de Bacilos Gram-positivos, estafilococos, estreptococos assim como bactérias da família *Enterobacteriaceae* e de entre os anaeróbios destacam-se *Prevotella spp.* (Tille, 2017; Rampersaud et al., 2012).

As infeções do trato genital feminino podem ser devidas à microbiota após desequilíbrio da flora normal ou serem doenças sexualmente transmissíveis (DST). *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Treponema pallidum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* ou outros micoplasmas, *Haemophilus ducreyi* e *Klebsiella granulomatis* são os principais responsáveis por DST (Tille, 2017; Vandepitte et al, 2003).

A vaginite é uma inflamação da mucosa vaginal relativamente comum causada principalmente por *Candida albicans*, uma levedura, assim como por *Trichomonas vaginalis*, protozoário flagelado e por *S. agalactiae*, *E. coli* e *Enterococcus spp.*

Outra infeção relativamente comum em mulheres é a vaginose bacteriana, com etiologia polimicrobiana. O mecanismo exato para o desenvolvimento de vaginose não está inteiramente esclarecido, mas sabe-se que está associado a uma redução de *Lactobacillus spp.* com um consequente aumento no pH vaginal e ao crescimento excessivo de *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus spp.*, *Prevotella spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Bacteroides spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, e *Mycoplasma spp.* (Tille, 2017; Rampersaud et al., 2012).

A partir das 35 semanas de gravidez, o clínico requisita a pesquisa de *S. agalactiae*, uma das principais causas infecciosas de morbidade e mortalidade entre os recém-nascidos, através de exposição direta durante a passagem através da vagina. Esta pesquisa realiza-se em meio Granada, que permite a identificação, facilitada pelo facto das colónias de *S. agalactiae* serem cor-de-laranja a salmão.

Para além da inoculação em meios de cultura, faz-se também esfregaço em lâmina para coloração de Gram. Deve avaliar-se a presença, por exemplo de diplococos Gram-negativos intracelulares ou extracelulares, indicativos de *N. gonorrhoeae*. Mais de quatro leucócitos por campo de imersão em óleo (100x) são indicação de uretrite/vaginite. A vaginose para além de ser caracterizada por uma secreção com cheiro fétido, também pode ser diagnosticada a partir de “clue cells”, células epiteliais escamosas cercadas por bacilos e cocobacilos gram-variáveis.

Para além do exame cultural em exsudado cervico-vaginal, o clínico pode ainda requisitar a pesquisa de antígeno de *C. trachomatis* em zaragatoa do endocervix e pesquisa de micoplasma urogenitais.

2.1.11.1. Pesquisa de antígeno de *C. trachomatis* em zaragatoa do endocervix

C. trachomatis é uma bactéria intracelular obrigatória e tal como as restantes bactérias da família *Chlamydiaceae* têm um ciclo de vida único com formas infecciosas metabolicamente inativas (corpos elementares) e formas não infecciosas, metabolicamente ativas (corpos reticulados). Infecções por *C. trachomatis* são DST e estão associadas cervicite, uretrite, endometrite, a infertilidade e gravidez ectópica nas mulheres; uretrite e epididimite em homens e pneumonia e conjuntivite de inclusão em recém-nascidos infetados durante o parto. Muitas vezes a infeção é assintomática, resultando na transmissão inadvertida e altas taxas de prevalência (Tille, 2017).

A pesquisa de antígeno de *C. trachomatis* faz-se através de um teste imunocromatográfico, que deteta todos os serotipos, após extração a partir de uma zaragatoa inserida no endocervix.

2.1.11.2. Diagnóstico de micoplasma urogenitais

Mycoplasma spp. e *Ureaplasma spp.* são as menores bactérias de vida livre, ao contrário das restantes não têm parede celular e sua membrana celular contém esteróis. A colonização vaginal com *Ureaplasma spp.* assim como por *Mycoplasma hominis* (*M. hominis*) ocorre numa grande percentagem de mulheres. A transmissão para o feto pode ocorrer após infeção ascendente ou disseminação através da placenta ou aquando o parto levando à colonização da pele, mucosas e trato respiratório (Rampersaud *et al.*, 2012). *Ureaplasma* pode causar uretrite, pielonefrite, parto prematuro ou aborto espontâneo e *M. hominis* pode causar pielonefrite, febres pós-parto e infeções sistêmicas em pacientes imunodeprimidos. *Ureaplasma spp.* são uma causa frequente de corioamnionite e infeção fetal, nomeadamente pneumonia, sepsis e meningite (Rampersaud *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2016).

Para a pesquisa de micoplasma urogenitais utiliza-se um *kit* constituído por um caldo de cultura seletivo com elementos nutritivos e elimina as principais bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e fungos; um caldo com Ureia e Arginina e uma galeria que permite a identificação de *Ureaplasma urealyticum*, identificação de *M. hominis*, contagem indicativa e teste de sensibilidade a 9 antibióticos.

2.2. Identificação dos microrganismos e provas de suscetibilidade aos antibióticos

Após a inoculação, incubação e valorização das amostras procede-se à identificação e às provas de suscetibilidade aos antibióticos. A identificação tem em conta a coloração de Gram e a morfologia das bactérias; aspeto macroscópico das colónias, nomeadamente a sua forma, dimensão, elevação, margem, produção de pigmentos ou tipo de hemólise que apresentam e provas bioquímicas.

2.2.1. Coloração de Gram e visualização ao microscópio

A coloração de Gram é realizada em esfregaços de amostras ou a partir de colónias isoladas nas placas, no sistema de coloração automático *PREVI Color Gram*, que já as fixa previamente. Esta coloração utiliza cristal violeta como corante, iodo como mordente, mistura safranina-acetona como descorante (acetona) e corante de contraste (safranina).

Bactérias gram-positivas possuem parede celular de camada espessa, constituída principalmente por peptidoglicano, que retém o corante primário, conferindo às bactérias a cor típica roxa ao microscópio (Figura 8).

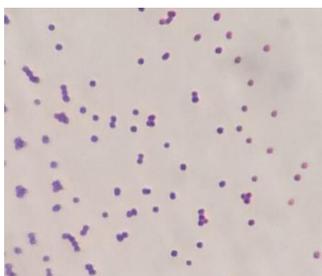


Figura 8. Cocos Gram-positivo. [Foto captada no serviço de Patologia]

As bactérias Gram-negativas possuem uma parede celular mais complexa, com duas camadas externas à membrana citoplasmática, sendo a membrana mais interna uma fina camada de peptidoglicano e a mais externa, exclusiva das bactérias gram-negativas constituída por



Figura 9. Bacilos Gram-negativo. [Foto captada no serviço de Patologia].

lipopolissacarídeos, fosfolípidos e proteínas. A acetona consegue extrair o complexo de cristal violeta-iodo devido à fina camada de peptidoglicano e à membrana externa rica em lípidos, descorando-as e o corante de contraste cora-as de rosa (Figura 9) (Murray *et al.*, 2016). Assim, este método de coloração baseia-se na capacidade das bactérias Gram-positivas reterem o corante cristal violeta no citoplasma durante a descoloração, ao contrário das bactérias Gram-negativas, devido às características das suas paredes celulares.

Para além desta coloração, avalia-se também a morfologia celular (cocos, bacilos, cocabacilos, fusiformes, curvas ou espirais) e arranjos celulares (individuais, ou agrupadas aos pares, em cacho ou em cadeia) que podem ser indicativos do tipo de bactéria se isolado a partir da amostra biológica.

2.2.2. Exame cultural, provas de identificação e sensibilidade a antibióticos

Primeiramente, identifica-se a morfologia e a coloração Gram a partir do esfregaço da amostra em lâmina ou de colónias isoladas, normalmente repicadas da placa-mãe, onde também são realizados os testes de identificação presuntiva para depois se proceder à identificação e antibiograma no sistema automatizado *Phoenix 100* da *Becton e Dickinson* (Anexo 3) ou, em alternativa a este pelo *Vitek 2* da *Biomérieux* (Anexo 4).

2.2.2.1. Gram-positivos

Após identificação de cocos Gram-positivos deve fazer-se o teste da catalase (Anexo 5), de modo a diferenciar *Micrococcus* spp. e *Staphylococcus* spp., que são catalase positivos, de *Enterococcus* spp. e *Streptococcus* spp., catalase negativos. Para além disto, deve avaliar-se a forma do seu agrupamento se a lâmina foi realizada a partir da amostra, por exemplo cocos em cacho são indicativos de *Staphylococcus* spp., aos pares indicam *S. pneumoniae*, em cadeia são indicativos de *Streptococcus* spp.; a forma e a cor da colónia, assim como o tipo de hemólise apresentado em meio COS.

Se o teste da catalase for positivo, em colónias indicativas de *Staphylococcus* spp., devem diferenciar-se as bactérias coagulase positivas (*S. aureus*) das coagulase negativas (normalmente *S. epidermidis* ou *S. saprophyticus*) pelo teste PAXTOREX STAPH-PLUS (Anexo 6). Após estes testes, realiza-se a identificação definitiva e concomitantemente a sensibilidade a antibióticos pelo painel para bactérias Gram-Positivas (PMIC/ID) do BD Phoenix™. Pode ainda realizar-se o antibiograma a partir de discos impregnados com Oxacilina, Teicoplanina e Vancomicina, utilizando a técnica de *Kirby-Bauer* (Anexo 7).

Se o teste for negativo para catalase, presume-se que seja *Enterococcus* spp. ou *Streptococcus* spp. Deve então ter-se em conta o tipo de hemólise que as colónias apresentam (Figura 10). Para microrganismos α -hemolíticos, realiza-se o teste de resistência à Optoquina (Anexo 8), podendo avaliar-se ainda se o tipo de agrupamento em amostra é em pares (diplococos é indicativo de *S. pneumoniae*). Para microrganismos β -hemolíticos, faz-se o teste de aglutinação PAXTOREX STREP que permite a sua diferenciação nos grupos A, B, C, D, F, G, de *Lancefield*.

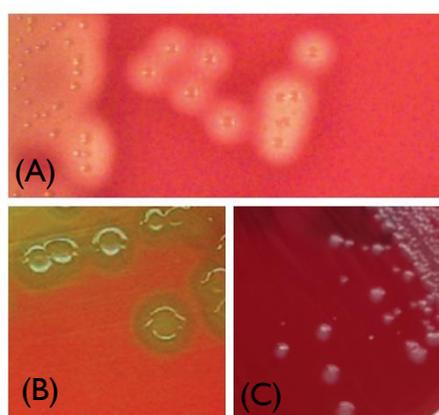


Figura 10. Diferentes tipos de hemólise. **(A)** β - Hemólise. **(B)** α - Hemólise. **(C)** γ - Hemólise. [Imagem (A) e (B) adaptadas de Tille (2017) e foto (C) captada no Serviço de Patologia.]

Após estes testes, realiza-se a identificação definitiva e a sensibilidade a antibióticos pelo painel para *Streptococcus* do BD Phoenix™ (SMIC/ID). Para microrganismos com γ

hemólise, i.e., sem hemólise, realiza-se o teste da Hidrólise da Esculina em meio BEA e realiza-se identificação definitiva e a sensibilidade a antibióticos pelo painel para bactérias Gram-Positivas do BD Phoenix™.

Frequentemente, a deteção de bacilos Gram-positivos, tais como *Corynebacterium* spp., na maior parte das amostras em utentes imunocompetentes é considerada como contaminação.

2.2.2.2. Gram Negativos

Depois de se identificar um bacilo Gram-negativo, deve ter-se em conta o meio em que este se encontra e a situação clínica, aliás como em todas as amostras.

No caso das coproculturas, pesquisa-se *Salmonella* spp. e *Shigella* spp., caso o clínico não dê outra informação, logo, no meio de *MacConkey* as colónias devem ser incolores, indicador de não-fermentadores de lactose e nos meios SS e *Hektoen*, semeados com a amostra ou repicados do caldo GN devem identificar-se as colónias incolores com ou sem centro negro (indicativo de produção de H₂S por *Salmonella* spp.) e a partir daí fazer a sua identificação definitiva e antibiograma pelo painel para bactérias Gram-negativas (NMIC/ID) do BD Phoenix™.

Para colónias em meio *Campylobacter*, deve fazer-se uma coloração de Gram a partir de colónia isolada, para pesquisar bacilos Gram-negativos curvos, para além de realizar o teste da catalase (cujo resultado é variável) e da oxidase (Anexo 9), que tem de ser positivo para o resultado ser dado como positivo para *Campylobacter* spp..

No caso de outras amostras inoculadas em *McConkey*, colónias rosa dão indicação de bactérias da família *Enterobacteriaceae* e colónias incolores apontam para *Proteus* spp. (possui cheiro *sui generis* e *swarming*), *Acinetobacter* spp. ou *P. aeruginosa* (cheiro *sui generis*, diferencia-se por ter citocromo c oxidase e produzir piocianina e pioverdina, que dá um tom esverdeado).

Organismos Gram-negativos em meio CLED são identificados e avalia-se a sua suscetibilidade aos antibióticos pelo painel bactérias Gram-negativas (UNMIC/ID) do BD Phoenix™.

Quando só se observa crescimento em PVX e não há crescimento em *MacConkey*, isto pode indicar a presença de *Haemophilus* spp., por isso, deve fazer-se o teste dos fatores V, X e VX (Anexo 10), identificação pela carta NH do *Vitek 2* e antibiograma pela galeria *ATB™ HAEMO EU*.

Em amostras suspeitas, em que se observarem diplococos Gram-negativos intracelulares ou não, pode suspeitar-se de *Neisseria* spp.. Em PVX/VCAT, *N. gonorrhoeae*

aparece em colónias pequenas, branco-acinzentadas, convexas, translúcidas e brilhantes, com margens lisas ou irregulares. Em relação a *N. meningitidis* e *Moraxella catarrhalis*, em PVX apresentam, respetivamente, colónias lisas, redondas, com aspeto húmido, branco/cinza e mucoides e colónias rosa a castanho, convexas e que se destacam intactas do meio. Deve realizar-se o teste da Oxidase, positivo para Neisseria e carta NH do Vitek 2.

2.2.2.3. Anaeróbios

Se um microrganismo consegue crescer em Gelose SCS em anaerobiose e não cresce em Gelose de Chocolate ou Gelose de Sangue em aerobiose, indica que é um anaeróbio obrigatório. Neste caso, deve-se fazer a identificação presuntiva pelo disco *An-Ident Ther-Scientific*™, baseado na sua resistência ou sensibilidade aos antibióticos e utilizar a carta ANC do Vitek 2, que necessita como informações adicionais a morfologia, coloração Gram e aerotolerância.

3. Exame micobacteriológico

Na secção de Microbiologia realiza-se também a pesquisa de micobactérias, nomeadamente do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, responsáveis pela tuberculose. Estes microrganismos são bacilos que podem ser levemente curvos e aeróbios. A sua parede celular é composta por ácido N-glicolilmurâmico, e tem um conteúdo em ácidos micólicos muito alto, por isso são denominados bacilos acido-álcool resistentes (BAAR), difíceis de corar por Gram, são resistentes a detergentes, a antibióticos comuns e apresentam crescimento lento (Tille, 2017; Murray et al., 2016).

As amostras mais comuns para pesquisa de micobactérias são secreções brônquicas, mas também se pode fazer a partir de urina, fezes, pus, LCR e outros líquidos biológicos estéreis, sangue e medula óssea. A emissão de micobactérias não é contínua, por isso devem colher-se secreções brônquicas, urina e fezes, em três dias consecutivos.

Visto que a transmissão se faz por gotículas (aerossóis infecciosos que são produzidos quando as pessoas doentes tosem, espirram ou falam, por manipulação de lesões ou processamento de amostras clínicas em laboratório) são tomadas algumas medidas de segurança. Existe uma sala própria, câmara de fluxo laminar nível II sem ligação ao exterior, centrífugas com retenção de aerossóis e cuidados específicos com as amostras no sentido de reduzir aerossóis, retê-los ou destruí-los se a amostra vazar (Tille, 2017).

Na maioria das amostras, a mucina e as células confinam as micobactérias e há também contaminação com outros organismos, que vão dificultar o seu crescimento em cultura, por isso é necessário fazer a descontaminação das bactérias contaminantes, liquefação,

homogeneização e concentração das micobactérias (Tille, 2017). A secreções brônquicas, urina, fezes em água destilada e pus aplica-se o método de descontaminação do N-acetil-L-cisteína com 2% hidróxido de sódio (NALC - NaOH) (Anexo 11).

Após este tratamento das amostras, é colocada uma gota numa lâmina para posterior coloração por fluorescência (Auramina) e os meios são inoculados. Os meios que se utilizam são o meio sólido de *Lowenstein-Jensen* ou *Coletsos* (no caso de LCR) e o meio líquido MGIT (*Middlebrook 7H9*), colocado no sistema BD BACTEC MGIT 960. Esta combinação de diferentes meios é necessária para otimizar a recuperação de micobactérias (Tille, 2017).

Os meios sólidos são incubados em aerobiose a 35°, durante os dois primeiros dias deitados, para que a amostra impregne bem e com a tampa desapertada. Posteriormente aperta-se a tampa e são examinados semanalmente até se perfazerem 8 semanas. A alteração de cor do meio de *Lowenstein-Jensen* e a presença de colónias com aparência de “couve-flor” indicam positividade.

Os frascos com meio líquido contêm um composto fluorescente sensível à presença do oxigénio e são monitorizados a cada 60 minutos durante 42 dias. Em caso de positividade ou de suspeita realiza-se uma lâmina para coloração de Kinyoun, para confirmação e contagem do número de BAAR.

O método de coloração por fluorescência de Auramina utiliza fenol de forma a solubilizar a parede lipídica para o corante conseguir penetrar, depois aplica-se o agente de descoloração ácido-álcool de modo a que os restantes microrganismos não o retenham,

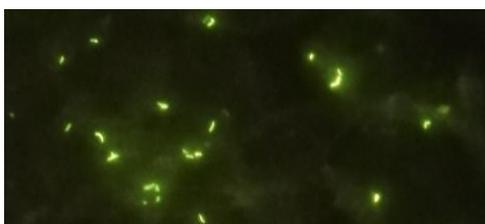


Figura 11. Bacilos fluorescentes amarelo esverdeado em fundo escuro sugestivo de *Mycobacterium* spp. (coloração Auramina). [Foto captada na secção de Microbiologia do serviço de Patologia Clínica.]

adicionando-se por fim o permanganato de potássio como contra coloração. Este método é o mais sensível, já que a lâmina pode ser vista com baixa ampliação para a procura dos bacilos fluorescentes amarelo esverdeado que se destacam do fundo escuro (Figura 11) para depois se analisar com uma maior ampliação e pode também ser corada pelo método de Kinyoun, posteriormente.

O método de Kinyoun é similar ao da coloração de Ziehl-Neelsen, mas sem aplicação de calor, o que a torna mais prática e diminui a produção de aerossóis. A solução de carbolfucsina de Kinyoun é aplicada em primeiro lugar, seguindo-se a mistura de ácido-álcool e, por fim, azul de metileno.

Os bacilos ácido-resistentes vão ter uma cor púrpura a vermelho, levemente curvados, curtos ou longos e pode ainda ver-se o aspeto em “cordão”, em lâminas a partir de culturas (Figura 12) (Tille, 2017).

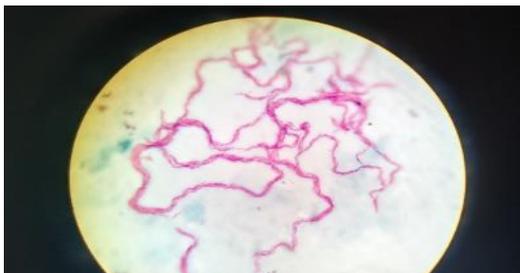


Figura 12. Agrupamento dos bacilos em ramos alongados e tortuosos (em cordão) bactéria do Complexo *M. tuberculosis*, após cultura e coloração Kinyoun. [Foto captada no Serviço de Patologia Clínica.]

Quando se suspeita de uma amostra positiva e esta cresce nos meios de cultura, enviam-se os mesmos para um laboratório exterior, para aí se realizar a identificação definitiva e antibiograma da micobactéria.

4. Exame micológico

Os fungos são causas cada vez mais importantes de infeções devido ao número crescente de indivíduos imunodeprimidos, assim como sujeitos a cirurgias e a terapia antibacteriana de longa duração. O isolamento e identificação de fungos saprófitas e potencialmente patogénicos constitui um desafio pois, ao contrário dos patógenos primários, tem de saber quando os valorizar (Tille, 2017).

Os fungos podem ser divididos em dois grupos distintos as leveduras e os fungos filamentosos. As leveduras, unicelulares, reproduzem-se por brotamento ou fissão e formam colónias redondas, pastosas ou mucosas. Os fungos filamentosos/bolores, multicelulares são compostos por estruturas tubulares denominadas hifas, com colónias bastante características que podem ser descritas como algodoadas, lanosas, aveludadas, entre outros. Existem ainda alguns fungos dimórficos e patogénicos que alterem a sua forma conforme a temperatura, teor de CO₂ e condições nutricionais (Tille, 2017).

As leveduras *Candida* spp., nomeadamente *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei* são as principais causas de infeções fúngicas, sendo que *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula* spp. e *Trichosporon* spp. também podem estar implicados.

Quanto aos fungos filamentosos *Aspergillus* spp., particularmente *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* são os mais implicados em infeções como oportunistas e *Fusarium* sp., *Acremonium* sp., zigomicetes e dermatófitos também podem ser isolados (Tille, 2017; Murray et al., 2016).

Quando o clínico solicita exame micológico ou se o utente é imunodeprimido inocula-se a amostra em meio *Sabouraud* com Gentamicina e Cloranfenicol (SGC) com incubação a 30°C entre 5 a 14 dias. Na suspeita de infeção generalizada, são realizadas hemoculturas nos frascos *Mycosis*, que incubam no sistema BACTEC durante 14 dias. Em caso de positividade

ou em utentes imunodeprimidos estas culturas são depois passadas para meio SGC e PVX e é feito um esfregaço para posterior coloração Gram.

4.1. Identificação de leveduras

As leveduras são identificadas tendo em conta características das colónias, características morfológicas microscópicas e provas bioquímicas. As colónias normalmente são lisas e de cor branca, podendo também ser bege ou salmão (característico de *Rhodotorula* spp.).

O exame microscópico após coloração Gram permite observar as leveduras unicelulares como Gram-positivas (Figura 13), redondas ou ovais (ANVISA, 2013).

Em algumas amostras, como por exemplo LCR ou após cultura, se houver suspeita de *Cryptococcus* spp., pode-se realizar a pesquisa de leveduras capsuladas com tinta da China. Nesta prova deve-se colocar uma gota de LCR ou uma porção de colónia a pesquisar com ansa esterilizada e uma gota de tinta da china numa lamela, cobrindo com lamela para observação ao microscópio. Se houver presença de cápsula, há um halo à volta das leveduras que contrasta com

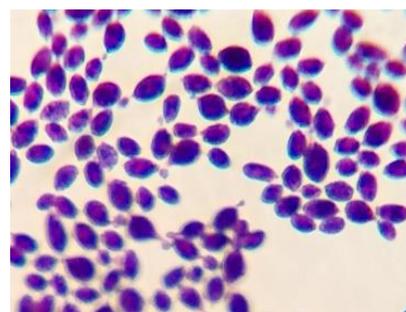


Figura 13. Leveduras (Coloração de Gram). [Foto captada no Serviço de Patologia].

o fundo preto. Pode ainda fazer-se a pesquisa do antigénio capsular pelo teste *PastorexTM Crypto Plus*, um teste qualitativo/semi-quantitativo que por aglutinação, deteta o polissacárido capsular de *Cryptococcus neoformans*. Além disso, em amostras positivas permite fazer a sua titulação que dá uma informação do estado de gravidade da infeção, como também da eficácia do tratamento. Este resultado só é dado como positivo se houver crescimento de *Cryptococcus neoformans* em cultura (ANVISA, 2013).

Outra prova que se realiza é a Prova da Blastese, para distinguir *Candida albicans* das restantes. Num tubo com 0,5 ml de soro humano, coloca-se uma porção de colónia que incuba a 37°C durante 3 horas no máximo, visto que após este tempo, outras espécies de *Candida* nomeadamente *Candida dubliniensis*, também podem formar tubo germinativo. Na visualização

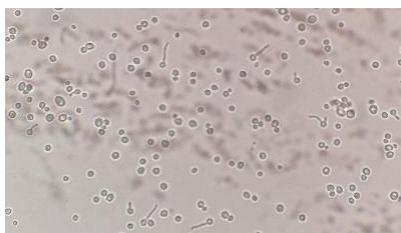


Figura 14. Prova da blastese positiva. [Foto captada no Serviço de Patologia].

ao microscópio, o tubo germinativo é pequeno filamento que brota da levedura, sem constrição (Figura 14) (Murray et al., 2016). Caso a prova seja positiva faz-se a prova de suscetibilidade aos antifúngicos pela carta YST AST do Vitek 2. Caso a prova seja negativa, faz-se a identificação e suscetibilidade aos antifúngicos pelas cartas YST ID e YST AST do Vitek 2.

5. Exame parasitológico

A pesquisa de parasitas intestinais é o exame parasitológico mais pedido pelo clínico. A maioria dos parasitas elimina ovos ou encontra-se nas fezes intermitentemente e, por esta razão, a colheita das fezes deve ser feita em dias alternados. A concentração das amostras também é preponderante devido ao baixo número de ovos, trofozoítos, cistos ou larvas. As amostras fecais devem ser tratadas com formalina a 10% para preservar a morfologia do parasita e devem ser posteriormente concentradas. A técnica usada no laboratório é de sedimentação, baseada na técnica de *Ritchie*, usando acetato de etilo para separar ovos, trofozoítos, cistos ou larvas da matéria orgânica fecal. Após centrifugação e decantação do sobrenadante, ressuspende-se o sedimento e observa-se uma gota entre lâmina e lamela (Tille, 2017).

Outra pesquisa que se faz sempre que se recebe um pedido de exame a exsudado cérvico-vaginal é a pesquisa de flagelados, nomeadamente *Trichomonas vaginalis*. A zaragatoa é ressuspensa num tubo com 1 ml de soro fisiológico e este é incubado a 37°C durante 30 minutos para depois se fazer a pesquisa dos seus trofozoítos a moverem-se em lâmina sob microscópio ótico, na objetiva de 40x.

6. Exame virológico

As constipações, a gripe e síndromes gripais assim como a gastroenterite são as infeções virais mais comuns.

Os principais vírus responsáveis por infeções do trato respiratório são Vírus Respiratório Sincicial (RSV), rinovírus, vírus influenza e parainfluenza, adenovírus e coronavírus, que se encontram em aerossóis, alimentos, água, saliva, nas mãos ou em fómites. As crianças com menos de 10 anos são especialmente suscetíveis a infeções graves devido a vírus influenza, vírus parainfluenza, RSV e adenovírus, devendo fazer-se a pesquisa de todos eles. Bebés com menos de 2 anos de idade são especialmente vulneráveis a bronquiolite devido a RSV, o que pode exigir hospitalização.

O aspirado nasofaríngeo é a amostra ideal pois consegue-se recuperar mais células epiteliais infetadas e deve ser enviado imediatamente ou refrigerado a 4°C até 24 horas. Quando o clínico solicita a pesquisa de vírus respiratórios, realiza-se o *RSV-Adenovirus Balea*, um teste imunocromatográfico para deteção de antígenos do RSV e do Adenovírus e, se este der negativo para ambos, realiza-se a pesquisa pelo *Respiratory Viral Screening & Identification MAb da Vircell*. Este método de imunofluorescência direta é baseado na reação de anticorpos específicos (MAb) marcados com Isotiocianato de fluoresceína (FTIC) com antígenos de adenovirus, influenza A, influenza B, parainfluenza 1, parainfluenza 2, parainfluenza 3 e RSV em

estratos celulares apropriados. Numa amostra positiva, duas ou mais células intactas exibem um padrão de fluorescência “verde-maçã” característico enquanto que numa amostra negativa as células estão vermelhas com um fraco padrão ou sem fluorescência (Murray *et al.*, 2016). Caso o clínico suspeite de gripe realiza-se a pesquisa dos Vírus Influenza A e B e RSV por *Xpert® Xpress Flu/RSV*, que utiliza métodos moleculares (PCR em tempo real) para fazer a sua deteção.

As infeções do trato gastrointestinal por parte de vírus podem resultar em gastroenterite, vómitos ou diarreia. Os principais implicados são adenovírus e rotavírus assim como *Norwalk*, calicivírus e astrovírus. A diarreia em crianças mais velhas e adultos geralmente é autolimitada e pode ser tratada com reidratação, no entanto, em bebés pode ser mais grave e levar a hospitalização. Os serotipos A, B e C de rotavírus e adenovírus 40 e 41 são as principais causas de gastroenterite infantil (Murray *et al.*, 2016). A pesquisa destes dois vírus é realizada através do teste *SD BIOLINE Rota/Adeno*, um teste imunocromatográfico que permite detetar antígenos do grupo A de rotavírus e de adenovírus.

IMUNOQUÍMICA

O setor de Imunoquímica compreende as análises de Bioquímica Clínica assim como de Imunologia. O soro é a principal amostra recebida, permitindo análises bioquímicas no sentido de avaliar funções dos diferentes órgãos, imunologia, marcadores tumorais, marcadores cardíacos, endocrinologia, eletroforese de proteínas, entre outros. Recebe-se ainda sangue em tubos com K₃EDTA para a determinação do BNP e hormona adrenocorticotrófica (ACTH), urina, fezes, LCR e outros fluidos biológicos.

Este setor encontra-se organizado em três divisões, numa delas realiza-se a receção dos tubos, preparação de alíquotas, a sua triagem e centrifugação. Os tubos seguem para a outra divisão onde se encontram os aparelhos para as determinações bioquímicas, de imunologia e eletroforeses. Existe ainda uma divisão específica para a realização da análise sumária de Urina tipo II, para a extração de calprotectina das fezes e para a realização de técnicas de serologia manual.

Da equipa de trabalho desta secção, fazem parte cinco Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica que realizam a manutenção dos aparelhos, assim como calibrações e Controlos de Qualidade Interno, fazendo ainda a receção das amostras, a sua triagem e a certificação de que todas as análises são realizadas, assim como procedem à validação dos resultados que necessitam de intervenção. Os dois Técnicos Superiores de Saúde têm como função a sua coordenação, assim como a verificação do Controlo de Qualidade Interno (CQI), a responsabilidade pelo Controlo de Qualidade Externo, bem como a validação técnica dos resultados, podendo ainda assistir nas restantes tarefas.

Visto que este é um setor muito automatizado, a intervenção dos técnicos faz-se principalmente ao nível da calibração, controlos de qualidade e validação técnica. Antes de se fazer o processamento das amostras, devem realizar-se as calibrações necessárias e CQI respetivos. Uma nova curva de calibração deve ser realizada sempre que a anterior tenha expirado, quando um novo reagente de lote diferente do anterior seja colocado no autoanalisador ou se o valor do reagente do CQI se encontrar fora dos limites definidos como aceitáveis, mesmo após repetição, mostrando um erro sistemático.

O CQ no laboratório permite a monitorização das determinações analíticas no sentido da deteção de erros e, assim, evitar resultados incorretos das amostras. O CQI é realizado a partir de amostras controlo comerciais, analisadas em paralelo, podendo controlo ser direcionado apenas para um parâmetro ou para vários, comparando-se os valores determinados com os valores esperados, reportados pela casa comercial. Os valores esperados são representados por intervalos de valores com limites superior e inferior, os limites de controlo. Parâmetros com regulação homeostática mais apertada e,

consequentemente, valores muito baixos de variação biológica, tais como o sódio, cloreto ou albumina, precisam de limites de controlo mais rigorosos, ao passo que parâmetros com grande variação biológica como, por exemplo, enzimas e triglicéridos não requerem limites de controlo tão estreitos (Ricós *et al.*, 2009). Os resultados são apresentados num gráfico *Levey-Jennings*, que representa graficamente os valores observados do controlo ao longo do tempo com os limites de controlo superior e inferior. Estes gráficos são interpretados tendo em conta várias regras (Regras de *Westgard*) que estabelecem um critério para julgar se um processo analítico está, ou não, fora de controlo (McCudden *et al.*, 2010). Quando os valores observados estão fora dos limites de controlo, devem verificar-se os prazos de validade dos controlos, calibradores e reagentes, saber se o controlo foi bem reconstituído e o técnico deve tomar medidas, nomeadamente, voltar a processar o controlo, utilizar um novo controlo ou recalibrar o parâmetro em questão.

A seção de Imunoquímica participa dos dois programas de avaliação externa NEQAS E RIQAS, para a determinação de vários parâmetros laboratoriais, havendo um calendário organizado por semanas. As amostras, depois de devidamente reconstituídas, são analisadas da mesma forma que as amostras de pacientes e os resultados são reportados. O programa de avaliação externa, compila todos resultados dos laboratórios que participam e envia um relatório de desempenho para cada um.

Conclusão

O estágio realizado no Serviço de Patologia Clínica da ULSAM foi crucial para a minha formação académica e profissional, bem como para o meu desenvolvimento pessoal, visto que me permitiu comprovar que a área das Análises Clínicas, para além de sempre me ter despertado grande interesse é também aquela em que quero desempenhar funções enquanto profissional na área da saúde.

O Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra tem uma forte componente teórica e obriga à realização de um estágio profissionalizante nas suas diferentes valências. Ao longo do meu estágio fui constatando que o seu plano de estudos é bastante completo e que prepara o aluno de forma adequada para o trabalho pretendido e no sentido de aplicar os conhecimentos adquiridos à prática laboratorial. Assim, o estágio permitiu-me tanto consolidar como aprofundar os conhecimentos por mim adquiridos nas diferentes unidades curriculares associadas às diversas áreas de diagnóstico laboratorial, como também constatar que todas elas se encontram interligadas, dando-me uma visão mais holística desta área profissional.

Todos os profissionais do Serviço de Patologia Clínica me fizeram sentir integrada e disponibilizaram-se para esclarecer todas as minhas dúvidas, assim como me explicaram como funciona a rotina laboratorial, as metodologias e os princípios inerentes às várias determinações laboratoriais. A importância da Gestão da Qualidade, o Controlo de Qualidade Interno e o Controlo de Qualidade externo tornou-se clara e evidente. Deste modo, temas que na unidade curricular se encontravam num plano mais abstrato, em contexto prático foram de muito mais fácil compreensão.

Considero ainda que a realização do estágio me proporcionou o desenvolvimento de várias competências, nomeadamente o trabalho em equipa, coordenação e organização, maior destreza na realização de técnicas manuais e capacidade de pensamento crítico em relação aos resultados obtidos.

Bibliografia

ADEWOYINI, AS; NWOGOH, B. - Peripheral blood film - a review. *Annals of Ibadan Postgraduate Medicine*. 12, 2 (2014), 71-79.

ANAGNOSTOPOULOS, K *et al.* - Effect of HbS in the determination of HbA2 with the Menarini HA-8160 analyzer and comparison with other instruments. *International Journal of Laboratory Hematology*. 31, (2009), 665-672.

AVIVI, Irit; GOLDSTONE, Anthony - Aetiology and management of non-Hodgkin's lymphoma, In: HOFFBRAND, Victor; CATOVSKY, Daniel; TUDDENHAM, Edward. *Postgraduate Haematology*. Oxford: Blackwell Publishing, 2005. ISBN 1-4051-0821-5. p. 235- 278.

BAIN, Barbara - Blood Cell Morphology in Health and Disease. In: BAIN, Barbara *et al.*. *Dacie and Lewis Practical Haematology*. China: Elsevier, 2017. ISBN: 978-0-7020-6696-2. p. 62-89.

BAIN, Barbara; PATH F - Diagnosis from the Blood Smear. *The New England Journal of Medicine*. 353, 5 (2005), 498-507.

BARON, Ellen *et al.* - *Cumitech 1C, Blood Cultures IV*. Washington, D.C.: E. J. Baron. ASM Press, 2005.

BARROS, M; LARANJEIRA P - Identificação de Cristais de Urato Monossódico no Líquido Sinovial. *Acta Farmacêutica Portuguesa*. 5, 1 (2016), 57-67.

BEM, Andreza; KUNDE, Juliana - A importância da determinação da hemoglobina glicada no monitoramento das complicações crônicas do diabetes mellitus. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 42, 3(2006), 185-191.

BRACONNIER, François – Évaluation de l'analyseur Menarini HÁ-8160 pour le dosage des hémoglobines glyquées: Interférence des hémoglobines anormales en CLHP. *Spectra Biology*. 141(2004), 38-44.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde - Módulo 8: Detecção e identificação de fungos de importância médica. Brasília: Anvisa, 2013.

BRIGGS, Carol *et al.* - Performance evaluation of the Sysmex haematology XN modular system. *Journal of Clinical Pathology*. 65, (2012), 1024-1030.

BRIGGS, Carol; BAIN, Barbara - Basic Haematological Techniques. In: BAIN, Barbara *et al.*. *Dacie and Lewis Practical Haematology*. China: Elsevier, 2017. ISBN: 978-0-7020-6696-2. p. 18-38.

BRUNS, David; ROUSSEAU, Francois; BURTIS, Carl - Química Clínica, Diagnóstico Molecular e Medicina Laboratorial. In: BRUNS, David; BURTIS, Carl. *Tietz Fundamentos de Química Clínica e Diagnóstico Molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. ISBN 978-85-352-8166-8. p. 72-78.

CARREIRO-LEWANDOWSKI, Eileen – Basic Principles and Practices. In: BISHOP, Michael; FODY, Edward; SCHOEFF, Larry. *Clinical Chemistry: techniques, principles, correlations*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. ISBN 978-0-7817-9045-1. p. 3-32

DUNNING, K; SAFO, AO - The ultimate Wright-Giemsa stain: 60 years in the making. *Biotechnic & Histochemistry*. 86, 2 (2011), 69-75.

ELGHETANY, Tarek; BANKI, Katalin - Distúrbios eritrocitários. In: MCPHERSON, Richard; PINCUS, Matthew. *Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais de Henry*. São Paulo: Manole, 2012. ISBN 978-85-204-5185-4. p.589-634

- FONSECA, Ana *et al.* - Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia. Ministério da Saúde/Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2004.
- FUJIMOTO, Keiji – Principles of Measurement in Hematology Analyzers Manufactured by Sysmex Corporation. Sysmex Journal International. 9, 1(1999), 31-44.
- GENEBRA, World Health Organization(WHO) – Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Geneva: WHO. 1999
- GENEBRA, World Health Organization(WHO) – WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. Geneva, 2010. ISBN 978-92-4-154778-9
- GOLLER, Fernanda; WAZLAWICK, Marlise, RUCKER, Barbara - Efeitos e importância do uso do fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) em pacientes oncológicos submetidos a quimioterapia citotóxica. Infarma. 23, 7/8 (2011), 8-14.
- HAYS, Taru; JAMIESON, Bette - Atlas of Pediatric Peripheral Blood Smears. 1ª Ed. Denver: Abbott, 2008.
- HOFFBRAND, A.; MOSS, P. (2011a)– Anemias megaloblásticas e outras anemias macrocíticas. In: Fundamentos em Hematologia. Porto alegre: Artmed, 2011. ISBN: 978-1-4051-9890-5. p. 59-72
- HOFFBRAND, A.; MOSS, P. (2011b)– Plaquetas, coagulação do sangue e hemostasia. In: Fundamentos em Hematologia. Porto alegre: Artmed, 2011. ISBN: 978-1-4051-9890-5. p. 315-327.
- HOFFBRAND, Victor; GREEN Ralph - Megaloblastic anaemia. In: HOFFBRAND, Victor; CATOVSKY, Daniel; TUDDENHAM, Edward. Postgraduate Haematology.Oxford: Blackwell Publishing, 2005. ISBN 1-4051-0821-5. p. 60-83.
- HUMPHRIES, Romney; LINSKOTT, Andrea - Laboratory Diagnosis of Bacterial Gastroenteritis. Clinical Microbiology Reviews. 28, 1 (2015), 3-31
- KARSAN, Aly *et al.* – An Evaluation of Hemoglobin Determination Using Sodium Lauryl Sulfate. American Journal of Clinical Pathology. 100, (1993), 123-126.
- KRISTENSEN, Gunn; MEIJER, Piet - Interpretation of EQA results and EQA-based trouble shooting. Biochemia Medica. 27, 1(2017), 49-62.
- KUREC, Anthony; LIFSHITZ, Mark - Conceitos gerais e questões administrativas. In: MCPHERSON, Richard; PINCUS, Matthew. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais de Henry. São Paulo: Manole, 2012. ISBN 978-85-204-5185-4. p. 4-13.
- LAMY, Brigitte *et al.* -How to Optimize the Use of Blood Cultures forthe Diagnosis of Bloodstream Infections? AState-of-theArt. Frontiers in Microbiology. 7, (2016), 1-13.
- LAYTON, Mark; ROPER, David - Investigation of the Hereditary Haemolytic Anaemias: Membrane and Enzyme Abnormalities. In: BAIN, Barbara *et al.*. Dacie and Lewis Practical Haematology. China: Elsevier, 2017. ISBN: 978-0-7020-6696-2. p. 228-251.
- LEHNER, Joachim; GREVE, Burkhard; CASSENS, Uwe - Automation in Hematology. Transfusion Medicine Hemotherapy. 34, (2007), 328-339.
- LIGOZZI, Marco *et al.* - Evaluation of the VITEK 2 System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Medically Relevant Gram-Positive Cocci. Journal of clinical microbiology.40, 5 (2002),1681–1686.MATOS, Januária - Índice de anisocitose eritrocitária (RDW): diferenciação das anemias microcíticas e hipocrômicas. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 30, 2 (2008), 120-123.

- MATHUR, Sharad; SCHEXNEIDER, Katherine; HUTCHISON, Robert – Hematopoese. In: MCPHERSON, Richard; PINCUS, Matthew. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais de Henry. São Paulo: Manole, 2012. ISBN 978-85-204-5185-4. P. 566-587.
- MCCARTER, Y *et al.* - Cumitech 2C, Laboratory Diagnosis of Urinary Tract Infections. Washington, DC: ASM Press, 2009. ISBN 978-1-55581-517-2.
- MCCUDDEN, Christopher *et al.* - Method Evaluation and Quality Management. In: BISHOP, Michael; FODY, Edward; SCHOEFF, Larry. Clinical Chemistry: techniques, principles, correlations. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. ISBN 978-0-7817-9045-1. p. 88-120.
- MCNAMARA, Christopher - Collection and Handling of Blood. In: BAIN, Barbara *et al.*. Dacie and Lewis Practical Haematology. China: Elsevier, 2017. ISBN: 978-0-7020-6696-2. p.1-7
- MONTEIRO, Rita *et al.* - Abcesso pulmonar e empiema torácico Análise retrospectiva num Serviço de Medicina Interna. Acta Medica Portuguesa, 24, 2(2011), 229-240.
- MUNDT, Lillian; SHANAHAN, Kristy - Serous Body Fluids. In: Graff's textbook of routine urinalysis and body fluids. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011. ISBN 978-1-58255-875-2. p.241-251.
- MURRAY, Patrick; ROSENTHAL, Ken; PFALLER, Michael- Medical microbiology. 8ª Ed. Philadelphia: Elsevier, 2016. ISBN: 978-0-323-29956-5.
- NEOGI, Sohini - Pre-analytical phase in clinical chemistry laboratory. Journal of Clinical and Scientific Research. 62, 5(2016),171-178.
- NUNES, Ana Paula *et al.* - Heterogeneous Resistance to Vancomycin and Teicoplanin Among *Staphylococcus* spp. Isolated from Bacteremia. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. 11, 3(2007), 345-350.
- OSEI-BIMPONG, Andrew; BURTHEM, John – Supplementary Techniques Including Blood Parasite Diagnosis. In: BAIN, Barbara *et al.*. Dacie and Lewis Practical Haematology. China: Elsevier, 2017. ISBN: 978-0-7020-6696-2. p.93-110.
- PASTICCI, Maria *et al.* - Bactericidal activity of oxacillin and glycopeptides against *Staphylococcus aureus* in patients with endocarditis: Looking for a relationship between tolerance and outcome. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. (2011), 10:26.
- PENNSYLVANIA, Clinical and Laboratory Standards Institute - Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. 9ª Ed. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006. ISBN 1-56238-586-0.
- PIERRE, Robert – Reticulocytes Their Usefulness and Measurement in Peripheral Blood. Clinics in Laboratory Medicine. 22, 1(2002), 63-79.
- PORTUGAL, Direção Geral de Saúde - Prescrição e determinação da hemoglobina glicada A1c. Portugal: DGS, 2011.
- PORTUGAL, Direção Geral de Saúde - Prevenção e Controlo de Colonização e Infeção por *Staphylococcus aureus* resistente à Metilina (MRSA) nos Hospitais e Unidades de Internamento de Cuidados Continuados Integrados. Portugal: DGS, 2015.
- PORTUGAL, Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos - Prevenção da transmissão de enterobactérias resistentes aos carbapenems em hospitais de cuidados de agudos. Portugal: DGS, PPCIRA, 2017.
- PRATES, Romário *et al.* - Pseudothrombocytopenia: incidence and strategy for resolution in clinical laboratory. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. 53, 6 (2017), 382-387.

- RAMPERSAUD, Ryan; RANDIS, Tara; M., RATNER, Adam - Microbiota of the upper and lower genital tract. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. 17, (2012), 51-57.
- RAVANDI, Farhad; HOFFMAN, Ronald – Phagocytes. In: HOFFBRAND, Victor; CATOVSKY, Daniel; TUDDENHAM, Edward. *Postgraduate Haematology*. Oxford: Blackwell Publishing, 2005. ISBN 1-4051-0821-5. p. 277-300.
- RICÓS, Carmen *et al.* - Application of biological variation – a review. *Biochemia Medica*. 19, 3 (2009), 250-259.
- RINGSRUD, Karen; LINNÉ, Jean - Body Fluids. In: RINGSRUD, Karen; LINNÉ, Jean. *Urinalysis and Body Fluids: A Colortext and Atlas*. St. Louis: Mosby, 1995. ISBN: 978-0801670435. p. 186-217.
- RODAK, Bernadette; CARR, Jacqueline - *Clinical hematology atlas*. 5ª Ed. Missouri: Elsevier, 2017. ISBN: 978-0-323-32249-2.
- ROSENFELD, Louis - *Clinical Chemistry Since 1800: Growth and Development*. *Clinical Chemistry*. 48, 1 (2002), 186-197.
- SÃO PAULO, Grupo Interdisciplinar de Padronização da Hemoglobina Glicada- A1C – Atualização sobre hemoglobina glicada (A1C) para avaliação do controle glicêmico e para diagnóstico do diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais. São Paulo: Grupo Interdisciplinar de Padronização da Hemoglobina Glicada- A1C, 2009.
- SCHOORL, M *et al.* - Flagging performance of the Sysmex XN2000 haematology analyser. *International Journal of Laboratory Hematology*. 38, (2016), 160-166.
- SHARP, Susan *et al.* - *Cumitech 7B, Lower Respiratory Tract Infections*. Washington, D.C.: S. E. Sharp. ASM Press, 2004.
- STRASINGER, Susan; DI LORENZO, Marjorie (2008a) - Cerebrospinal Fluid. In: *Urinalysis and body fluids*. Philadelphia: F. A. Davis Company, 2008. ISBN 978-0-8036-1697-4. p.177-194.
- STRASINGER, Susan; DI LORENZO, Marjorie (2008b) - Synovial Fluid. In: *Urinalysis and body fluids*. Philadelphia: F. A. Davis Company, 2008. ISBN 978-0-8036-1697-4. p. 211-217.
- STRASINGER, Susan; DI LORENZO, Marjorie (2008c) - Serous Fluid. In: *Urinalysis and body fluids*. Philadelphia: F. A. Davis Company, 2008. ISBN 978-0-8036-1697-4. p. 221- 233.
- THEVARAJAH, Malath; NANI Nordin; CHEW YY - Performance evaluation of the Arkay Adams HA-8160 HbA1C analyser. *Malaysian Journal Pathology*. 30, 2 (2008), 81-86.
- TILLE, Patricia- *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*. 14ª Ed. Missouri: Elsevier, 2017. ISBN: 978-0-323-35482-0.
- VAJPAYEE, Neerja; GRAHAM, Susan; BEM, Sylva - Exame básico de sangue e medula óssea. In: MCPHERSON, Richard; PINCUS, Matthew. *Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais de Henry*. São Paulo: Manole, 2012. ISBN 978-85-204-5185-4. p. 535-565.
- VANDEPITTE, K *et al.* - *Basic laboratory procedures in clinical bacteriology*. 2ª Ed. Geneva: World Health Organization 2003. ISBN 92-4-154545-3.
- VASSILIOU, George; GREEN, Anthony - Myeloproliferative disorders. In: HOFFBRAND, Victor; CATOVSKY, Daniel; TUDDENHAM, Edward. *Postgraduate Haematology*. Oxford: Blackwell Publishing, 2005. ISBN 1-4051-0821-5. p. 761-782.
- WILD, Barbara; BAIN, Barbara - Investigation of Variant Haemoglobins and Thalassemias. In: BAIN, Barbara *et al.*. *Dacie and Lewis Practical Haematology*. China: Elsevier, 2017. ISBN: 978-0-7020-6696-2. p. 282-309.

WIN, Nay; RICHARDS, Stephen - Acquired Haemolytic Anaemias. In: BAIN, Barbara *et al.*. Dacie and Lewis Practical Haematology. China: Elsevier, 2017. ISBN: 978-0-7020-6696-2. p. 254-278.

Anexos

Anexo I - Procedimentos para colheita e transporte de diferentes amostras.

Amostra	Colheita	Transporte
Urina	<p>Jacto intermédio - deve ser colhida a primeira urina da manhã, após lavagem das mãos e da zona genital (da zona genital para anal) com sabão neutro. Homens devem fazer a retração do prepúcio e mulheres os lábios vaginais. Deve rejeitar-se a primeira porção de urina e colher o jacto intermédio não havendo interrupção da micção.</p> <p>Algaliação - em utentes algaliados deve-se aspirar a amostra do cateter. O cateter deve ser clampado e a sua superfície deve ser limpa com etanol a 70%. Através de uma agulha e seringa procede-se à aspiração. Urina do saco coletor é inadequada, pois os microrganismos multiplicam-se e dissimulam os números relativos verdadeiros.</p> <p>Aspiração suprapúbica - indicada em crianças ou utentes em que os resultados são de difícil interpretação. A bexiga deve estar cheia e após desinfeção a urina é aspirada diretamente para uma seringa através de uma agulha inserida por via percutânea garantindo uma amostra sem contaminação e a única que permite a pesquisa de anaeróbios.</p> <p>Saco coletor - indicado para bebés. Após lavagem da zona genital deve colocar-se o saco e esperar 30 minutos. Se o bebé não urinar deve voltar a lavar-se e a colocar novo saco.</p>	<p>Se a urina não contiver nenhum tipo de conservante e não for refrigerada o seu transporte e processamento deve ser de no máximo duas horas. Se for transportada num tubo com ácido bórico tem estabilidade de 48 horas. Se for conservada a 4°C tem estabilidade de 24 horas. O volume de urina colocado no tubo deve ser de 3 ml para garantir o crescimento da maioria dos microrganismos, que podem ser inibidos pelo ácido bórico e reduzir o crescimento de algumas bactérias, nomeadamente <i>Enterococcus spp.</i></p>
Fezes	<p>Visto que os microrganismos podem ser eliminados de forma intermitente, a colheita de amostra em 3 dias aumenta a recuperação e a probabilidade de identificar o agente patogénico. A amostra deve ser do tamanho de uma noz, não deve estar contaminada com urina ou papel higiénico pois pode conter sais de bário, para um frasco estéril. Para exsudados retais deve ser introduzida uma zaragatoa no recto até 2,5 cm, rodando-a e retirando cuidadosamente. A zaragatoa deve apresentar conteúdo fecal, para assegurar uma boa qualidade de amostra.</p>	<p>O transporte para o laboratório deve ser até 1 hora após colheita. Evitar refrigeração</p>
Trato respiratório	<p>Secreções brônquicas- não devem ser ingeridos alimentos 1 a 2 horas antes e a cavidade bucal deve ser enxaguada com solução salina ou água imediatamente antes da expetoração. Deve-se expetorar com tosse profunda, preferencialmente de manhã, para um recipiente estéril. Pode-se ainda induzir a expetoração com nebulização de NaCl 0,85%.</p> <p>Lavado brônquico e broncoalveolar - infundir solução salina estéril na árvore broncoalveolar e aspirar o líquido assim como células, proteínas e microrganismos.</p> <p>Exsudado nasal- Inserir uma zaragatoa estéril em cada narina até encontrar resistência e rodar contra a mucosa. Colocar em meio de transporte.</p>	<p>As amostras devem ser transportadas para o laboratório imediatamente até 1 hora após colheita, se não for possível refrigerar até 24 horas.</p>
Hemoculturas	<p>A colheita faz-se por punção venosa depois de se desinfetar o local com álcool 70% de modo circular e do interior para a periferia e solução alcoólica iodada a 1%, durante 30 segundos. Desinfetar a borracha do frasco BACTEC com álcool, inocular o frasco sem mudar de agulha. Normalmente, para os adultos colher 2 frascos para aeróbios e 1 para anaeróbios com 8 a 10 ml cada um e em sítios de punção diferente, ou, se não for possível, em</p>	<p>Os frascos devem ser transportados imediatamente para o laboratório e colocado no sistema automatizado para detetar microrganismos em cultura de sangue BACTEC</p>

	tempos de colheita diferentes e para crianças colher um frasco pediátrico para aeróbios.	
Cateter	Desinfetar a pele com Álcool 70%, retirar o cateter, e cortar asépticamente cerca de 3 a 5 cm e enviar num frasco estéril.	O frasco deve ser de imediato transportado e processado no laboratório.
LCR	Colheita por punção lombar- desinfetar o local da punção e colher o LCR para 3 tubos esterilizados, com encerramento hermético, sendo o último, utilizado para exame bacteriológico, pois tem mais probabilidade de ser o menos contaminado. Deve ter pelo menos 1 ml para exame bacteriológico, 2 ml para exame micológico e 3 ml para micobacteriológico.	Os frascos devem ser de imediato transportados e processados no laboratório.
Flúidos: Pleural, Peritoneal e Sinovial	Colheita por aspiração da cavidade peritoneal (paracentese), da cavidade pleural (toracentese) ou da articular (artrocentese), após desinfecção do local semelhante a hemoculturas. Colocar a amostra num contentor estéril com tampa. Para pesquisa de anaeróbios, a colheita faz-se em seringa expelindo o ar. Podem também ser inoculados em frascos para hemocultura.	Os frascos, seringas ou frascos de hemoculturas devem ser de imediato transportados e processados no laboratório.
Exsudados purulentos	Exsudados devem ser colhidos para contentor estéril ou ser enviados diretamente em seringas com tampa. Em exsudados de lesões abertas devem ser colhidos, após desbridamento, com zaragatoa com meio de transporte. Biópsias devem ser colhidas de forma asséptica com cerca de 0,5 cm e colocadas em frasco estéril.	Os frascos, seringas ou zaragatoas devem ser imediatamente transportados e processados até 2 horas após colheita.
Exsudado endocervical, Exsudado uretral	O exsudado endocervical é colheito após o colo do útero ter sido exposto por um espéculo humedecido com água morna e após o muco ectocervical ter sido eliminado com uma zaragatoa posteriormente inserida no meio de Amies. Para a colheita de exsudado uretral, é inserida uma zaragatoa na uretra e rodada antes de se retirar. Como <i>Chlamydia trachomatis</i> é intracelular, é importante remover as células epiteliais da mucosa endocervical. São necessárias zaragatoas separadas para deteção de clamídia, micoplasmae ureaplasma.	Para pesquisa de <i>Mycoplasma hominis</i> e <i>Ureoplasma spp.</i> colocar a zaragatoa no meio próprio e enviar logo ao abrigo da luz. Para pesquisa de <i>Chlamydia trachomatis</i> , a zaragatoa não deve estar em meio de transporte e deve ser processada o mais rápido possível ou ser refrigerada até 72 h.
Exsudado auricular/ocular	Exsudados oculares - pus da superfície do saco conjuntival inferior e do canto interno do olho é colhido com zaragatoa estéril para as culturas. Exsudados auriculares - no caso de otite média, timpanocentese realizada pelo clínico. Se for uma otite externa pode realizar-se a colheita com zaragatoa da pele do canal auditivo e colocar em meio de transporte.	Transportar em menos de duas horas para o laboratório.

(Tille, 2017)

Anexo 2 - Meios de Cultura utilizados na seção de Microbiologia.

Meio	Descrição	Incubação
Gelose Cystine Lactose Electrolyte Deficient (CLED)	Meio diferencial para microrganismos uropatógenos, permitindo diferenciar fermentação da lactose, através do azul de bromotimol como um indicador de pH (organismos que fermentam a lactose irão reduzir o pH e alterar a cor do meio para amarelo). A cistina permite o crescimento de bactérias coliformes com colónias anãs. A deficiência em eletrólitos inibe a proliferação de <i>Proteus</i> spp..	Aerobiose, 37° C durante 24 horas
Gelose MacConkey (MCK)	Meio diferencial e seletivo para enterobactérias e outros bastonetes Gram-negativos. O cristal violeta e sais biliares inibem as bactérias Gram-positivas. O indicador de pH, vermelho neutro, permite diferenciar os fermentadores de lactose, que apresentam uma cor rosa-vermelho.	Aerobiose, 37° C durante 24 horas
Gelose Salmonella Shigella (SS)	Isolamento de <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i> graças a sais biliares, verde brilhante e citratos. Devido à presença vermelho neutro, bactérias que fermentam lactose formam colónias vermelhas. O tiosulfato de sódio e o citrato férrico permitem a deteção da produção de sulfureto de hidrogénio pela <i>Salmonella</i> , como se pode verificar pelas colónias com centros pretos.	Aerobiose, 37° C durante 24 horas
Gelose Hektoen (HE)	Meio seletivo e diferencial para <i>Salmonella</i> spp. e <i>Shigella</i> spp. Os sais biliares inibem Gram-positivos e reduzindo o crescimento Gram-negativos, permitindo crescimento de <i>Salmonella</i> spp. e <i>Shigella</i> spp.. Os açúcares presentes são lactose, sacarose e salicina e os indicadores do pH são fucsina ácida e azul de bromotimol. Microrganismos que fermentam levam a mudança de cor para cor-de-laranja. O citrato de amónio férrico e tiosulfato de sódio presentes no meio permitem a deteção da produção de sulfureto de hidrogénio pela <i>Salmonella</i> .	Aerobiose, 37° C durante 24 horas
Gelose Campyloset (CAM)	Isolamento de <i>Campylobacter coli</i> e <i>C. jejuni</i> graças antibióticos e antifúngicos, que inibem a maior parte dos restantes microrganismos. Agentes redutores e sangue de carneiro permitem o crescimento de colónias de <i>Campylobacter</i> spp. pequenas e acinzentadas com crescimento ao longo das estrias.	Microaerofilia, 42°C durante 48 horas
Gelose Tiosulfato, citrato, bÍlis e sacarose (TCBS)	Isolamento de <i>Vibrio</i> spp. O tiosulfato e citrato de sódio, bÍlis e colato permitem um pH alcalino que inibe Gram-positivos e coliformes e permite o desenvolvimento de <i>Vibrio cholerae</i> , sensÍvel a ambientes ácidos. A concentração elevada de sais favorece o desenvolvimento de <i>Vibrio cholerae</i> que é halotolerante e outros <i>Vibrio</i> , halófilos. Os indicadores de pH são o azul de bromotimol e o azul de timol.	Aerobiose, 37° C 24-48 horas
Gelose Cefsulodina-Irgasan-Novobiocina (CIN)	Isolamento de <i>Yersinia</i> spp.. A fermentação de manitol na presença de vermelho neutro permite a formação de colónias de <i>Y. enterocolitica</i> de "olho de boi" incolor com um centro vermelho. O cristal violeta, desoxicolato de sódio e agentes antimicrobianos, cefsulodina, Irgasan e novobiocina, permitem a inibição de Gram-negativos e Gram-positivos.	Aerobiose, 37°C durante 24 horas
Gelose Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE)	Isolamento de <i>Legionella</i> spp. O extracto de levedura fornece proteínas e outros nutrientes necessários ao seu crescimento, necessitando ainda de L-cisteína e pirofosfato férrico e alfa-cetoglutarato. O carvão ativado decompõe o peróxido de hidrogénio, tóxico para <i>Legionella</i> spp. e tampão ACES é adicionado para manter o pH.	Atmosfera enriquecida com 5 a 10 % de CO ₂ 37°C, até 14 dias
Gelose Columbia com sangue de ovelha a 5% (COS)	Meio nutritivo que permite crescimento da maioria de bactérias. As peptonas e extracto de levedura são fonte de vitaminas, amido de milho absorve substâncias tóxicas. O sangue de ovelha permite a diferenciação do tipo de hemólise e fornece o factor X.	Atmosfera enriquecida com 5 a 10 % de CO ₂ 37° C, 24 a 72 horas

Gelose Chocolate com mistura PolyViteX(PVX)	Permite crescimento de bactérias fastidiosas, nomeadamente <i>Neisseria</i> spp., <i>Haemophilus</i> spp. e <i>Streptococcus pneumoniae</i> , O meio base Gelose de Chocolate fornece caseína e peptonas de carne, tampão de fosfato e mantém o pH, a hemoglobina fornece o fator X e a mistura PolyViteX fornece o factor V vitaminas, aminoácidos, coenzimas, dextrose, ião ferro.	Atmosfera enriquecida com 5 a 10 % de CO ₂ 37°C, 24 a 72 horas
Gelose Chocolate com mistura PolyviteX Vancomicina, Colistina, Anfotericina B, Trimetoprim (VCAT)	Isolamento de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Neisseria meningitidis</i> . Vancomicina, Colistina, Anfotericina B, Trimetoprim-sulfametoxazole inibem as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e leveduras existentes nas amostras polimicrobianas, nomeadamente exsudado vaginal.	Atmosfera enriquecida com 5 a 10 % de CO ₂ 37°C, 24 a 72 horas
Gelose Gardnerella com 5% sangue humano (GAR)	Isolamento de <i>Gardnerella vaginalis</i> . Colistina e ácido nalidíxico inibem as bactérias Gram-negativas e anfotericina B inibe leveduras. O meio é suplementado com Peptona. O sangue humano permite detetar β-hemólise característica.	Atmosfera enriquecida com 5 a 10% de CO ₂ 37° C, 48 horas
Gelose Granada (Group B Streptococcus Differential Agar)	Isolamento e identificação de estirpes hemolíticas <i>Streptococcus agalactiae</i> , que formam colónias cor-de-laranja/salmão, devido ao pigmento <i>granadaene</i> que necessita de <i>Proteose Peptone no. 3</i> e amido para a sua estabilização.	Anaerobiose, 37°C 48 horas
Gelose Schaedler com 5% Sangue Ovelha (SCS)	Meio especialmente para cultura de anaeróbios obrigatórios. A hemina e o heme do sangue de ovelha permitem o crescimento de anaeróbios estritos e outras substâncias. A vitamina K importante para o crescimento de <i>Prevotella melaninogenica</i> , assim como algumas espécies de <i>Bacteroides</i> spp. e Gram-positivos não formadores de esporos.	Anaerobiose, 37°C 48 horas
Gelose Mueller-Hinton II (MHII)	Meio utilizado para a realização de antibiogramas por difusão, permitindo o desenvolvimento de bactérias não fastidiosas, enterobacterias, bacilos gram negativos não fermentadores, <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp. A composição em Ca ²⁺ Mg ²⁺ e a baixa concentração em timina-timidina permite uma determinação mais precisa dos halos de inibição.	Atmosfera enriquecida com 5 a 10 % de CO ₂ /Aerobiose 37° C, 48 horas
Meio Fletcher	Meio semi-sólido com 5-fluorouracil, peptona e soro de coelho para o cultivo seletivo de <i>Leptospira</i> spp.. A baixa percentagem de agar cria um meio semi-sólido auxiliando na deteção de motilidade.	Aerobiose a temperatura ambiente e protegido do escuro, 6 semanas
Bile Esculina Agar (BEA)	Meio inclinado para isolamento e diferenciação de <i>Enterococcus</i> spp. e <i>Streptococcus</i> grupo D, que hidrolisam a esculina em esculetina e glucose. Restantes bactérias Gram-positivas são inibidas pelos sais biliares neste meio. A esculetina reage com citrato férrico e forma um complexo preto.	Aerobiose, 37°C durante 24 horas
Meio de Lowenstein-Jensen	Meio inclinado para desenvolvimento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e outras espécies de micobactérias. Contem verde malaquite para inibir bactérias que resistiram a contaminação, L-Asparagina e fécula de batata são fontes de nitrogenio e vitaminas, Fosfato monopotássico e Sulfato de Magnésio, para além de tampões, potenciam o seu crescimento. Os ovos fornecem ácidos gordos e proteínas necessários para o seu metabolismo e a a albumina coagula e forma uma superfície sólida e o glicerol serve como fonte de carbono e é favorável ao crescimento do bacilo da tuberculose do tipo humano.	Aerobiose, 35°C, 8 semanas
Coletso	Meio inclinado seletivo para o isolamento de micobactérias fastidiosas ou presentes em pequeno número, por exemplo no LCR. A solução de sais fornece nitrogénio, vitaminas, minerais e aminoácidos, verde malaquite inibe as bactérias, a gelatina e	Aerobiose, 35°C, 8 semanas

	solução oligodinamica favorecem o crescimento de <i>Mycobacterium</i> spp.	
Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol 2 (SGC)	Isolamento de fungos leveduriformes e filamentosos. As peptonas fornecem nitrogénio, a alta concentração de glucose e pH ácido permitem o desenvolvimento dos fungos enquanto que impedem crescimento de bactérias. Gentamicina e o cloranfenicol inibem a generalidade de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.	Aerobiose, 30°C, 5 a 14 dias
Caldo Tioglicolato (TG)	Caldo de enriquecimento da maior parte das bactérias, graças a peptona de caseína, caldo de soja e glicose. Tioglicolato, cistina e sulfito de sódio, agentes redutores e a concentração de agar reduzem a difusão de oxigénio no meio por isso anaeróbios, aeróbios e microaerofílicos conseguem desenvolver-se.	Aerobiose, 37° C durante 48 horas
Caldo Gram-negativo (GN)	Caldo seletivo para enteropatogéneos, <i>Salmonella</i> spp. e <i>Shigella</i> spp. O citrato de sódio e desoxicolato de sódio inibem bactérias Gram-positivas e estimulam crescimento de patógenos gram-negativos, o manitol é a fonte de carbono de patógenos e não é utilizado por bactérias entéricas não-patogénicas.	Aerobiose, 37° C durante 24 horas
Caldo Brain and Heart Infusion (BHI)	Caldo de enriquecimento, permitindo crescimento de microrganismos aeróbios fastidiosos. Peptona, extrato de cérebro e coração de porco são fontes de nitrogenio, carbono, enxofre e vitaminas.	Aerobiose, 37° C durante 72 horas
Caldo Schaedler com vitamina K₃	Caldo para desenvolvimento de microrganismos anaeróbios devido ao poder redutor, hemina, extrato de levedura e vitamina K ₃ .	Anaerobiose, 37°C durante 48 horas
MGIT	Meio líquido Middlebrook 7H9 enriquecido com meio OADC (albumina, catalase, glucose cloreto sódio) e uma mistura de antibióticos (PANTA) para a cultura de micobactérias no sistema BD BACTEC 960.	Aerobiose, 35°C durante 42 dias

(Tille, 2017; Murray et al., 2016)

Anexo 3 - BD Phoenix™ 100

O autoanalisador BD Phoenix™ executa a identificação (ID) e o Teste de Sensibilidade Antimicrobiana (AST) de bactérias a partir de painéis para Gram-positivas (PMIC/ID), Gram-negativas (NMIC/ID), específicos para bactérias Gram-negativas uropatogénicas (UNMIC/ID) e específicos para *Streptococcus* spp. (SMIC/ID).

Os painéis são inoculados após se realizar uma suspensão bacteriana, a partir de meios não seletivos e culturas puras com menos de 24 horas, em solução salina ID com densidade correspondente a 0,5 McFarland, medida no nefelómetro e se inocular o caldo AST com 0,25 µl dessa solução e com o indicador redox. A identificação faz-se por testes bioquímicos de fermentação, oxidação, degradação e hidrólise de substratos e leitura por colorimetria e fluorescência. O AST realiza-se com concentrações decrescentes de antibióticos e o indicador redox para a deteção do crescimento microbiano sendo que, a par com a identificação o resultado é dado como suscetível, intermediário ou resistente, de acordo com o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)*.

Anexo 4 - Vitek 2 Compact.

O sistema VITEK 2 faz a identificação de bacilos Gram-negativos (carta GN); cocos e bacilos Gram-positivos (carta GP); anaérobios e corinebactérias (carta ANC); *Neisseria* spp. e *Haemophilus* spp. (carta NH) e leveduras (carta YST) assim como testes de sensibilidade a diferentes antimicrobianos e antifúngicos por diferentes cartas. São preparadas suspensões bacterianas em solução estéril de cloreto de sódio a 0,45% e ajustadas a diferentes densidades consoante a carta utilizada. As cartas são automaticamente atestadas com a suspensão bacteriana, seladas e incubadas. Cada carta de identificação contém poços com diferentes substratos para avaliar o uso de fontes de carbono, atividade enzimática e resistências a antibióticos e cada carta de antibióticos tem poços com diferentes concentrações destes. Os poços são lidos por fluorómetros e fotómetros para registrar sinais de fluorescência, turbidez e colorimétricos (Ligozzi *et al.*, 2002).

Anexo 5 - Teste da Catalase

A enzima catalase converte o H_2O_2 a H_2O e O_2 , libertado sob a forma de bolhas. Numa lâmina de vidro deve colocar-se uma porção de colónia e uma gota de solução de H_2O_2 e observar se há formação de bolhas. O teste é positivo se a libertação de bolhas é marcada e

negativo se houver uma fraca ou nenhuma produção. Deve-se evitar tocar no meio de cultura que contenha sangue visto que este possui catalase. Este teste é principalmente usado para distinguir *Staphylococcus* spp. de *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp. (Tille, 2017).

Anexo 6 - Teste PAXTOREX STAPH-PLUS

O teste PAXTOREX STAPH-PLUS é um teste de aglutinação que permite a identificação de coagulase ligada (ou “clumping factor”), proteína A e polissacarídeo capsular de *S. aureus*. O reagente contém partículas de latex com fibrinogênio que reagem com o clumping factor, IgG que reage com a proteína A e anticorpos monoclonais específicos para os polissacarídeos capsulares, formando assim agregados. Este teste permite diferenciar *S. aureus*, principal estafilococo humano coagulase-positivo, de outros estafilococos (Tille, 2017).

Anexo 7 - Técnica de Kirby-Bauer para realização do Antibiograma

A técnica de Kirby-Bauer é um método qualitativo de difusão para realização do antibiograma, com discos de papel de filtro impregnados com um antibiótico. Utiliza-se como meio a Gelose *Mueller-Hinton*, tendo em atenção que fatores como pH, espessura do meio e concentração em iões podem afetar a precisão do resultado (Tille, 2017).

A partir de uma cultura pura, deve preparar-se uma suspensão em solução salina correspondente a 0,5 McFarland, equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC /ml. A gelose deve ser inoculada com uma zaragatoa que foi imersa nessa suspensão, em três direções diferentes para garantir uma distribuição uniforme e completa do inóculo sobre toda a placa. Os discos são colocados até 15 minutos após inoculação e as placas são invertidas e colocadas a incubar em atmosfera com 5% a 10% de CO₂, a 37°C durante 24 horas (Tille, 2017).

Após o tempo de incubação, deve avaliar-se se a densidade do inóculo está correta para se proceder à medição dos halos de inibição em torno dos discos. O antibiótico presente no disco difunde-se na gelose e estabelece um gradiente de concentração ao redor deste, sendo que concentração mais elevada é a mais próxima deste. As bactérias vão crescer na superfície da placa, exceto quando a concentração de antibiótico é suficiente para inibir o seu crescimento. Após a incubação, o diâmetro da zona de inibição em torno de cada disco é medido em milímetros.

Este teste é especialmente usado para *Staphylococcus* spp. com os discos de oxacilina, teicoplanina e vancomicina. O disco de oxacilina testa a suscetibilidade às penicilinas

resistentes à penicilinase já que é mais resistente à degradação enquanto está armazenado e deteta melhor as estirpes hétero-resistentes (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006). Um crescimento perceptível dentro da zona de inibição é indicativo da resistência à oxacilina (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006). A resistência a penicilinas é normalmente seguida a resistência à meticilina, que inclui resistência a todos os antimicrobianos β -lactâmicos (Pasticci et al., 2011). A vancomicina vem sendo amplamente utilizada como recurso no tratamento de infeções provocadas por estas bactérias e a teicoplanina, outro glicopeptido, é utilizada como terapia alternativa à vancomicina (Nunes et al., 2007).

Anexo 8 - Teste de susceptibilidade à optoquina.

A optoquina em concentrações baixas (5 μ g) inibe o crescimento de *S. pneumoniae* mas não de outros estreptococos α -hemolíticos, sendo útil para fazer a sua identificação presuntiva. Para a realização deste teste deve-se semear com a ansa cerca de 2 a 3 colónias no meio COS, em 3 direções e colocar o disco de 6mm de optoquina no centro. A incubação faz-se em atmosfera com 5% a 10% de CO₂ a 37°C durante 24 horas. Se houver crescimento até ao disco, a sua suscetibilidade para a optoquina é negativa para *S. pneumoniae*. Uma zona superior a 14 mm de inibição é considerada identificação presuntiva e inferior é duvidoso, tendo de ser confirmado com testes adicionais (Tille, 2017).

Anexo 9 - Teste citocromo c -oxidase (método de Kovac).

Este teste determina a presença de citocromo c oxidase a partir da oxidação do substrato tetrametil-p-fenilenediamina dihidroclorato 1% (reagente de Kovac) que atua como um aceitador de eletrões artificial para esta e forma o composto corado azul de indofenol. Numa lamela deve colocar-se um disco impregnado de reagente de Kovac em contacto com uma gota de água destilada e com um palito de plástico retirar uma colónia do meio e colocá-la no disco. Um teste positivo é indicado pelo desenvolvimento da cor roxa em poucos segundos. Este é um teste presuntivo de identificação de *Pseudomonas* spp., *Neisseria* spp. sendo também positivo para *Campylobacter* spp. (Tille, 2017).

Anexo 10 - Teste dos fatores V e/ou X.

O teste do fator X e V é usado para identificar e diferenciar *Haemophilus* spp. que precisam de fator X (hemina), fator V (nicotinamida adenina dinucleotídeo ou NAD) ou uma combinação de ambos. O procedimento é o mesmo para a realização de antibiograma (ANEXO 6). Os discos impregnados com X e V têm de ser colocados suficientemente perto para se poder avaliar se há crescimento entre eles e o disco XV deve ser colocado mais afastado. O teste é positivo para *H.influenzae* se só há crescimento em torno do disco XV e no meio dos discos V e X. É positivo para *Haemophilus parainfluenza* se houver um halo de crescimento em torno dos discos XV e V. *Haemophilus ducreyi* forma um halo de crescimento em torno dos discos XV e X. O teste é negativo se houver crescimento em todo o meio indicando que não há necessidade de fatores (Tille, 2017).

Anexo 11 - Descontaminação de bactérias: Método de N-acetil-L-cisteína com 2% hidróxido de sódio (NALC-NaOH).

A maioria dos espécimes de cultura de micobactérias contém detritos orgânicos e bactérias contaminantes, por isso é necessário proceder-se à sua liquefação e descontaminação, pelo método de N-acetil-L-cisteína com 2% hidróxido de sódio (NALC-NaOH). Este processo de descontaminação elimina os contaminantes, permitindo a recuperação das micobactérias que, devido à grande percentagem em lípidos são mais resistentes aos agentes ácidos e alcalinos. O NaOH atua como agente mucolítico e descontaminante e o NALC atua como um agente mucolítico diminuindo ainda a concentração do NaOH que é tóxico para algumas micobactérias. O citrato de sódio liga-se a iões de metais pesados que podem estar presentes na solução e inativam o NALC. O tampão de fosfato é usado para diluir a solução após a descontaminação e diminuir a gravidade específica para tornar a sedimentação das micobactérias mais eficaz.