



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Márcia Alexandra de Andrade Costa Gonçalves

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO**  
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

**Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas,  
orientado pela Professora Doutora Gabriela Jorge Silva e pelo Dr. António Gomes  
Fernandes e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.**

Outubro de 2020



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Márcia Alexandra de Andrade Costa Gonçalves

**Relatório de Estágio**  
**Mestrado em Análises Clínicas**

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Gabriela Jorge Silva e pelo Dr. António Gomes Fernandes e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Outubro de 2020



---

## AGRADECIMENTOS

Quero deixar o meu eterno agradecimento à minha mãe, pois sem o seu esforço não teria sido possível prosseguir a minha formação académica, nem ingressar neste mestrado. Agradeço-lhe ainda toda a força e apoio que sempre me deu, de forma a manter-me sempre focada nos meus objetivos.

Agradeço à minha irmã, por ser a minha melhor amiga e poder sempre contar com ela quando mais preciso, tendo sido um apoio fundamental ao longo do meu percurso académico.

Agradeço à Betania, a amiga que me acompanha desde o primeiro ano de licenciatura. Agradeço-lhe pela amizade, pelos conselhos, pelos serões de estudo e ajudas ao longo do mestrado, e por todos os momentos que temos partilhado juntas ao longo dos últimos anos.

Agradeço ao Jorge, pelo companheirismo e cumplicidade desta nossa amizade de longa data. Agradeço-lhe pela força e ajuda que sempre me deu, e acima de tudo por ser o meu ombro amigo.

Agradeço à Beatriz, a amiga que só conheci em Coimbra, mas que em pouco tempo se tornou muito importante. Agradeço-lhe pela amizade e por me ter apoiado ao longo deste mestrado, celebrando as minhas vitórias comigo e dando-me sempre força e positividade para superar as situações de maior dificuldade.

Agradeço ao Dr. António Gomes Fernandes por me ter recebido de braços abertos neste estágio, e por todo o apoio, compreensão e ajuda prestados.

Agradeço ao resto da equipa do Laboratório Germano de Sousa, em especial à Marta por toda a ajuda e partilha de conhecimentos, e pela confiança e cumplicidade criadas. Agradeço também à Raquel, à Isabel, à Catarina, à Sandra, à Vera, à Daniela e à Teresa, pela forma como sempre me fizeram sentir integrada na equipa, e por toda a disponibilidade e ajuda.

Por último, mas não menos importante, agradeço à Professora Doutora Gabriela Silva, por toda a disponibilidade e orientação prestadas ao longo da elaboração deste relatório.



---

# ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| Agradecimentos.....   | 2  |
| Índice.....   | 4  |
| Índice de Tabelas.....                                      | 6  |
| Índice de Figuras.....                                      | 6  |
| Lista de Abreviaturas.....                                  | 8  |
| Resumo.....   | 11 |
| Abstract.....   | 13 |
| 1. Introdução.....  | 15 |
| 2. Caracterização do Laboratório de Estágio.....            | 16 |
| 2.1 Fluxo de Trabalho no Laboratório.....                   | 17 |
| 2.2 Controlo de Qualidade.....                              | 18 |
| 2.2.1 Controlo de qualidade interno (CQI).....              | 18 |
| 2.2.2 Avaliação Externa da Qualidade (AEQ).....             | 19 |
| 3. Bioquímica.....  | 20 |
| 4. Imunologia.....  | 22 |
| 5. Microbiologia.....                                       | 25 |
| 5.1 Meios de cultura.....                                   | 26 |
| 5.2 Provas Bioquímicas.....                                 | 28 |
| 5.3 Equipamentos Automatizados.....                         | 29 |
| 5.3.1 <i>BACTEC 9050</i> .....                              | 29 |
| 5.3.2 <i>VITEK 2 COMPACT</i> .....                          | 30 |
| 5.4 Amostras biológicas e seu processamento.....            | 31 |
| 5.4.1 Urina.....  | 31 |
| 5.4.2 Fezes.....  | 34 |
| 5.4.3 Exsudado Vaginal.....                                 | 38 |
| 5.4.4 Exsudado Uretral.....                                 | 41 |
| 5.4.5 Pus de Feridas e Abscessos.....                       | 42 |
| 5.4.6 Amostras do Trato Respiratório.....                   | 44 |
| 5.4.7 Líquidos de Cavidades Serosas.....                    | 48 |
| 5.4.8 Sangue (Hemocultura).....                             | 48 |
| 6. Hematologia.....   | 50 |
| 6.1 Hemograma.....  | 50 |
| 6.1.1 Série Eritrocitária – Eritrograma.....                | 51 |
| 6.1.1.1 Série Eritrocitária - Alterações Quantitativas..... | 54 |
| 6.1.1.2 Série Eritrocitária - Alterações Qualitativas.....  | 55 |
| 6.1.2 Série Leucocitária – Leucograma.....                  | 59 |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 6.1.2.1 | Série Leucocitária – Alterações Quantitativas..... | 61 |
| 6.1.2.2 | Série Leucocitária – Alterações Qualitativas.....  | 63 |
| 6.1.3   | Série Plaquetária – Trombocitograma.....           | 65 |
| 6.1.3.1 | Série Plaquetária – Alterações Quantitativas.....  | 66 |
| 6.1.3.2 | Série Plaquetária – Alterações Qualitativas.....   | 68 |
| 6.2     | Velocidade de Sedimentação Eritrocitária.....      | 70 |
| 6.3     | Hemóstase e Coagulação .....                       | 71 |
| 7.      | Caso Clínico.....                                  | 73 |
| 8.      | Conclusão .....                                    | 75 |
| 9.      | Bibliografia .....                                 | 76 |

---

## ÍNDICE DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> - Parâmetros analíticos efetuados pelo <i>Dimension RXL Max</i> ..... | 21 |
| <b>Tabela 2</b> - Condições que elevam as diferentes populações de leucócitos.....    | 61 |
| <b>Tabela 3</b> - Condições que decrescem as diferentes populações de leucócitos..... | 62 |

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> – Gelose CPSE de urocultura positiva com <i>Escherichia coli</i> .....   | 32 |
| <b>Figura 2</b> – Gelose CPSE de urocultura com crescimento polimicrobiano.....  | 33 |
| <b>Figura 3</b> - <i>BinaxNOW® Streptococcus pneumoniae</i> e <i>BinaxNOW® Legionella</i> com resultado negativo.....                            | 33 |
| <b>Figura 4</b> – Observação microscópica de coloração de Gram feita a partir de colónias isoladas da gelose CAM.....                            | 35 |
| <b>Figura 5</b> – Observação microscópica de ovo fértil de <i>Ascaris Lumbricoides</i> em amostra de fezes.....                                  | 37 |
| <b>Figura 6</b> – Gelose SCG2 com colónias sugestivas de <i>Candida</i> spp.....   | 39 |
| <b>Figura 7</b> - Observação microscópica após prova da filamentação com elementos leveduriformes sugestivos de <i>Candida albicans</i> .....    | 39 |
| <b>Figura 8</b> – Gelose STRB com colónias de <i>Streptococcus agalactiae</i> . ....   | 40 |
| <b>Figura 9</b> - Observação microscópica de esfregaço de exsudado uretral corado com coloração de Gram. ....                                    | 41 |
| <b>Figura 10</b> – Gelose CNA com crescimento de colónias com beta-hemólise.....   | 43 |
| <b>Figura 11</b> – Diagrama de dispersão de reticulócitos.....   | 53 |
| <b>Figura 12</b> – Alterações morfológicas do eritrócito.....  | 55 |
| <b>Figura 13</b> - Observação microscópica de inclusões eritrocitárias em esfregaços de sangue periférico.....                                   | 57 |
| <b>Figura 14</b> – Observação microscópica de esfregaços de sangue periférico com <i>rouleaux</i> eritrocitário e aglutinação eritrocitária..... | 58 |
| <b>Figura 15</b> – Observação microscópica de alterações na série leucocitária em esfregaços de sangue periférico.....                           | 64 |
| <b>Figura 16</b> - Observação microscópica de agregação plaquetária e satelitismo plaquetário em esfregaços de sangue periférico.....            | 68 |
| <b>Figura 17</b> – Boletim Clínico. ....   | 73 |





---

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AEQ** – Avaliação Externa de Qualidade
- aPTT** – Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado
- BAAR** - Bacilos Ácido-Álcool Resistentes
- BHI** – Caldo cérebro-coração
- CAM** - Gelose *Campyloset*
- CHGM** – Concentração de Hemoglobina Globular Média
- CMI** - Concentração Mínima Inibitória
- CNA** – Gelose de Sangue, Colistina e Ácido Nalidíxico
- COS** – Gelose de Sangue
- CPSE** - Gelose CPS Elite
- CQI** – Controlo de Qualidade Interno
- DNA** - Ácido Desoxirribonucleico
- EDTA** – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- EPS** – Eletroforese das Proteínas Séricas
- ESP** – Esfregaço de Sangue Periférico
- EUCAST** - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
- Fator V** – Nicotinamida Adenina Dinucleótido
- Fator X** - Hemida
- GDH** – Glutamato Desidrogenase
- GS-CML** – Germano de Sousa – Centro de Medicina Laboratorial
- HAE2** – Gelose de Chocolate *Haemophilus* spp.
- Hb** – Hemoglobina
- HbA1c** – Hemoglobina Glicada
- HEKT** – Gelose *Hektoen*
- HFR** – Reticulócitos de Alta Fluorescência
- HGM** – Hemoglobina Globular Média
- Ht** – Hematócrito
- INR** – Razão Normalizada Internacional
- IRF** – Fração de Reticulócitos Imaturos
- ISI** - Índice de Sensibilidade Internacional
- ITU** – Infecção do Trato Urinário
- LFR** – Reticulócitos de Baixa Fluorescência
- LMA** – Leucemia Mielóide Aguda

**LMC** – Leucemia Mielóide Crónica  
**LSS** – Lauril Sulfato de Sódio  
**MCK** – Gelose *MacConkey*  
**MFR** – Reticulócitos de Média Fluorescência  
**MRSA** - *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente  
**MSA2** - Gelose de *Chapman*  
**NRBC** - Eritroblastos  
**PVX** - Gelose de Chocolate *PolyViteX*  
**RDW** – Amplitude de Distribuição de Eritrócitos  
**RET** - Reticulócitos  
**RNA** – Ácido Ribonucleico  
**rpm** – rotações por minuto  
**SEQC** - *Sociedad Española de Medicina de Laboratorio*  
**SGC2** - Gelose de *Sabouraud*  
**SGQ** – Sistema de Gestão de Qualidade  
**STRB** – Gelose Strepto B  
**TP** – Tempo de Protrombina  
**TSA** - Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana  
**UFC** – Unidades Formadoras de Colónias  
**UK NEQAS** - *United Kingdom National External Quality Assessment Service*  
**VCAT** - Gelose de Chocolate *PolyViteX* VCAT3  
**VGM** – Volume Globular Médio  
**VPM** – Volume Plaquetário Médio  
**VSE** – Velocidade de Sedimentação Eritrocitária



---

## RESUMO

O Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, culmina com a realização de um estágio curricular, cujo objetivo consiste em aplicar, em contexto de trabalho, os conhecimentos teóricos adquiridos ao longo das diversas unidades curriculares.

Este estágio curricular decorreu no laboratório Germano de Sousa – Centro de Medicina Laboratorial, inserido no Hospital CUF Viseu, e teve a duração de aproximadamente 600 horas. Ao longo do estágio, integrei e participei na rotina de funcionamento do laboratório, o que me permitiu consolidar conhecimentos e adquirir experiência na execução das mais variadas técnicas e tarefas.

O presente relatório, descreve o funcionamento do laboratório e as atividades desenvolvidas nos setores da Bioquímica, Imunologia, Microbiologia e Hematologia, nas quais participei. Contudo, são abordados de forma mais breve, os setores da Bioquímica e da Imunologia, e de forma mais aprofundada, os setores da Microbiologia e da Hematologia.

**Palavras-chave:** Análises Clínicas, Germano de Sousa, Hospital CUF, Microbiologia, Hematologia.



---

## ABSTRACT

The Master's Degree in Clinical Analysis, of the Faculty of Pharmacy, of the University of Coimbra, culminates with the completion of a curricular internship, whose objective is to apply, in the context of work, the theoretical knowledge acquired throughout the various course units.

This curricular internship took place at the Germano de Sousa - Laboratory Medicine Center, inserted in the CUF Viseu Hospital, and lasted approximately 600 hours. Throughout the internship, I integrated and participated in the laboratory's operating routine, which allowed me to consolidate knowledge and gain experience in the execution of the most varied techniques and tasks.

This report describes the operation of the laboratory and the activities developed in the sectors of Biochemistry, Immunology, Microbiology and Hematology, in which I participated. However, the sectors of Biochemistry and Immunology are covered in a more brief way, and, in more depth, the sectors of Microbiology and Hematology.

**Keywords:** Clinical Analysis, Germano de Sousa, Hospital CUF, Microbiology, Hematology.





---

## I. INTRODUÇÃO

As análises clínicas são um dos mais importantes meios de diagnóstico complementares, uma vez que permitem, através da recolha de materiais biológicos como urina, sangue, fezes, saliva ou outros tecidos, diagnosticar anomalias e/ou patologias, de maior ou menor gravidade, contribuindo ainda para a sua prevenção, deteção precoce e monitorização.

Ao longo dos anos, com vista à obtenção de resultados mais exatos, precisos e fidedignos, têm sido desenvolvidos métodos cada vez mais sensíveis, muitas vezes integrados em equipamentos automatizados. Estes conseguem processar um elevado número de amostras em curtos espaços de tempo, reduzindo a manipulação humana e conseqüentemente os erros humanos. O tempo entre a colheita da amostra e a disponibilização do resultado também acaba por diminuir, fator importantíssimo na evolução do estado clínico do doente. Para além disso, estes equipamentos conseguem ser integrados com os sistemas informáticos dos laboratórios, e assim comunicar os resultados automaticamente, sem ser necessário a introdução manual sujeita a erros. A existência de programas e estratégias de controlo da qualidade, quer interna como externa, torna-se também imprescindível para assegurar a qualidade dos resultados.

Num ano atípico, de pandemia, como aquele que vivemos atualmente, as análises clínicas vêm demonstrar ainda mais a sua importância, e o quanto as metodologias e equipamentos se revolucionam, e adaptam rapidamente àquilo que se quer detetar e diagnosticar.

O Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra oferece no primeiro ano um conjunto de unidades curriculares onde se adquirem os conhecimentos teóricos necessários para, no ano seguinte, poderem ser aplicados em contexto de trabalho no estágio curricular. No meu caso, o estágio decorreu no Laboratório Germano de Sousa - Centro de Medicina Laboratorial integrado no Hospital CUF Viseu, onde me foi possível integrar a rotina normal de trabalho, desde o acompanhamento da receção e triagem de amostras (fase pré-analítica), passando pela processamento das mesmas (fase analítica), até ao acompanhamento da validação de resultados. Apesar de ter passado pelas quatro grandes áreas de Análises Clínicas – Bioquímica, Imunologia, Hematologia e Microbiologia – no presente relatório abordarei resumidamente as áreas da Bioquímica e Imunologia e de forma mais completa as áreas da Microbiologia e Hematologia.

---

## 2. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO

O grupo Germano de Sousa realiza análises clínicas há 45 anos, tendo ao longo do tempo procurado dar respostas cada vez mais rápidas e melhores face à evolução e aos desafios da medicina. Contando atualmente com cerca de 450 postos de colheita distribuídos por todo o país, o laboratório tem ainda parcerias com empresas no âmbito da medicina do trabalho e alguns hospitais, fazendo também colheitas ao domicílio.

O laboratório Germano de Sousa – Centro de Medicina Laboratorial (GS-CML) integrado no Hospital CUF Viseu tem como diretor técnico o Dr. António Gomes Fernandes, Farmacêutico especialista em Análises Clínicas. O laboratório dá resposta a nível hospitalar ao serviço de urgência e ao posto de colheitas ambulatório do Hospital, bem como a nível comunitário, aos diversos postos de colheita externos, distribuídos por diferentes locais, dentro e fora de Viseu. O laboratório dispõe de uma sala ampla onde se encontra a área da Bioquímica e da Imunologia. Conta ainda com mais duas áreas laboratoriais, Microbiologia e Hematologia. Em apoio às áreas laboratoriais podemos encontrar ainda uma sala de lavagens, sala de triagem, gabinete de validação, receção e uma sala polivalente.

A principal preocupação do laboratório é fornecer resultados com qualidade de modo a satisfazer os clínicos e os utentes. Para isso é extremamente importante garantir todas as medidas de gestão da qualidade, para além de uma boa formação da equipa. Tudo isto com vista a aumentar a eficiência, facilitar a comunicação com o exterior e também estar sempre atualizado em relação aos avanços tecnológicos (novos testes, metodologias, equipamentos, entre outros).

---

## 2.1 FLUXO DE TRABALHO NO LABORATÓRIO

Na rotina diária do laboratório GS-CML Viseu, todo o processo se inicia com a fase pré-analítica. Sabe-se que é nesta fase que ocorre a maior parte dos erros que podem comprometer todo o resultado analítico, sendo fulcral que este processo seja efetuado com o maior rigor possível. Em primeiro lugar é necessário confirmar as análises pedidas na requisição e verificar se o utente reúne as condições necessárias à colheita, como por exemplo estar em jejum. Após a recolha dos produtos biológicos, estes devem ser transportados até ao laboratório o mais rápido possível de modo a garantir a viabilidade das amostras. Os produtos biológicos que provêm do Serviço de Urgência do Hospital chegam ao laboratório através de assistentes operacionais, enquanto que aqueles que provêm dos postos de colheita externos, chegam através de estafetas, que os transportam devidamente acondicionados em malas térmicas. De salientar que a cada amostra é atribuída uma etiqueta com código de barras e código alfanumérico, que vai permite a leitura por parte dos equipamentos, e estes automaticamente saberão quais os parâmetros analíticos que a amostra tem para determinar.

Os produtos do Serviço de Urgência chegam devidamente etiquetados e são triados e processados com a maior brevidade possível, uma vez que o clínico está à espera dos resultados para dar seguimento à terapêutica do doente. Os produtos rececionados dos postos de colheita externos, apesar de virem etiquetados, antes de serem processados são primeiro direcionados à sala de triagem. Este é um passo muito importante que tem de ser feito com a máxima atenção e concentração, uma vez que é no processo de triagem que se percebe qual o tipo de análises que o utente tem, se há análises para o exterior e se as colheitas foram efetuadas de acordos com as análises pedidas. É importante estar atento às não conformidades, como colheitas em tubos ou recipientes inapropriados, falta de identificação, amostra mal etiquetada, hemolisada e/ou com volume insuficiente, entre outras, para assim se proceder à aceitação ou rejeição das amostras. Posto isto, as que estão em conformidade são centrifugadas, se necessário, e de seguida separadas pelos diferentes setores, consoantes as requisições clínicas de cada uma. No entanto, nem todos os parâmetros são realizados no GS-CML Viseu. As amostras com análises para o exterior são separadas em alíquotas, armazenadas e enviadas para laboratórios externos com os quais o laboratório tem protocolos, nomeadamente o Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa (Laboratório Central) em Lisboa e o Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa no Porto, onde se encontra a unidade de citometria.

Após todo este processo, as amostras distribuídas pelas suas respectivas áreas, são processadas, sendo a grande maioria em equipamentos totalmente automatizados. Os resultados analíticos passam, em primeiro lugar, por uma validação a nível dos equipamentos, onde se comparam os resultados com os valores de referência e se efetuam repetições de alguns parâmetros, se necessário, conforme padrões previamente estabelecidos. Posteriormente os resultados sofrem uma validação final pelo Farmacêutico especialista do laboratório, onde são validadas a concordância entre os resultados de todas áreas e o histórico clínico do utente.

O laboratório GS-CML trabalha com um sistema informatizado designado *Apollo*, que permite a integração de todos os postos de colheita, validação dos resultados comunicados pelos aparelhos, elaboração de folhas de trabalho (análises por fazer ou a repetir), histórico clínico dos utentes e ainda uma rastreabilidade das amostras.

---

## 2.2 CONTROLO DE QUALIDADE

O Grupo Germano de Sousa encontra-se certificado de acordo com a Norma ISO 9001:2015, que através de um conjunto de normas visa orientar a implementação e manutenção de um sistema de gestão de qualidade (SGQ). Torna-se fulcral que um laboratório adote um SGQ, com vista a garantir a máxima fiabilidade e rigor dos resultados, e assim uma melhor qualidade dos serviços prestados. Neste sentido, o laboratório GS-CML Viseu aplica vários controlos de qualidade internos (CQI), estando também inserido em vários programas de avaliação externa da qualidade (AEQ).

---

### 2.2.1 CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO (CQI)

O CQI avalia a precisão analítica e consiste num conjunto de controlos de preparações comerciais onde a concentração de cada analito é conhecida, existindo sempre níveis normais e níveis patológicos. Os controlos são realizados diariamente ou semanalmente, consoante o parâmetro e o equipamento, sendo utilizados 2 ou 3 níveis de controlo. A partir dos dados fornecidos pelas bulas que acompanham os controlos, são desenhadas automaticamente nos equipamentos cartas de *Levey Jennings*, sendo os critérios de análise previamente estabelecidos pelo diretor técnico e feitos com base nas regras de *Westgard*. As cartas são diariamente

monitorizadas pelos responsáveis de cada setor, e mensalmente avaliadas pelo responsável da qualidade e pela direção do laboratório, assegurando assim o rigor nos resultados dados ao utente e facilitando a identificação de não conformidades.

O CQI é ainda complementado com calibrações periódicas ou sempre que há novos lotes de reagentes, e ainda com manutenções semanais e mensais aos equipamentos automatizados.

---

## 2.2.2 AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE (AEQ)

A AEQ visa avaliar a exatidão analítica, havendo para isso uma avaliação comparativa entre o desempenho do nosso laboratório e outros que participem no programa. Neste sentido, são enviadas amostras cegas pelo laboratório responsável pela avaliação, que são processadas como uma amostra normal. Os resultados obtidos são comparados com o valor real da amostra, e com os resultados obtidos pelas outras entidades participantes que usem as mesmas metodologias. Assim, é possível aferir o desempenho de um certo método ou equipamento, alertando para eventuais erros e necessidade de ações corretivas, em benefício da fiabilidade dos resultados.

O laboratório GS-CML Viseu está inserido em vários programas de AEQ como o *da Sociedad Española de Medicina de Laboratorio (SEQC)*, *United Kingdom National External Quality Assessment Service (UK NEQAS)* e o Plano Nacional de Avaliação Externa da Qualidade Laboratorial do Instituto Ricardo Jorge.

---

### 3. BIOQUÍMICA

A grande maioria dos produtos biológicos que chegam ao laboratório GS-CML Viseu, apresentam requisição para a determinação de parâmetros bioquímicos pelo que o grande volume das amostras é concentrado nesta área. De facto, esta é uma área complexa que permite avaliar a maioria das funções do organismo, desde a função hepática, renal, pancreática, cardiovascular, entre outras.

A amostra principal é o soro, cuja colheita de sangue é feita para um tubo sem anticoagulante, com esferas ativadoras da coagulação e gel separador. Depois da colheita, estas amostras são sujeitas a uma centrifugação de 3000 rotações por minuto (rpm), durante 10 minutos. Para além do soro, chegam também a este setor as amostras de urina, colhidas para recipientes estéreis, no caso de amostras ocasionais, ou para contentores com maior capacidade para as urinas de 24h. Antes de serem processadas, são colocadas em tubos de separação para serem centrifugadas a 3000 rpm, durante 5 minutos. A partir daí podem ser processadas.

O laboratório GS-CML Viseu está equipado neste setor por três equipamentos automatizados. Dois deles são o **Dimension® RxL Max** da **Siemens**, destinados a determinações de parâmetros analíticos relacionados com o metabolismo dos glúcidos, metabolismo proteico, metabolismo mineral e ósseo, função hepática, função renal, função pancreática e função cardíaca. Estas determinações são feitas através de métodos enzimáticos, cinéticos, espetofotométricos, turbidimétricos e potenciométricos. A unidade ISE, que ambos têm incorporada, é a que garante as determinações das espécies iónicas por potenciometria. Apesar de serem ambos iguais, um dos equipamentos está direcionado para as amostras urgentes que poderão chegar do Serviço de Urgência, pelo que deverá manter-se livre. Por conseguinte, o outro equipamento destina-se às amostras de rotina. Os principais parâmetros analíticos determinados pelo **Dimension RxL Max** bem como a metodologia associada, encontram-se na tabela I.

**Tabela I** – Parâmetros analíticos efetuados pelo *Dimension RXL Max*.

| <b>Função</b>                              | <b>Analito</b>   | <b>Metodologia</b>                             |
|--|--|--|
| <b>Equilíbrio Hidroeletrólítico</b>        | Sódio<br>Potássio<br>Cloreto                                       | Potenciometria com elétrodos seletivos de iões |
| <b>Metabolismo dos Lípidos</b>             | Triglicerídeos<br>Colesterol<br>Colesterol HDL                     | Ensaio de cor enzimático                       |
|  | Colesterol LDL   | Cálculo através da fórmula de Friedwald        |
| <b>Metabolismo dos Hidratos de Carbono</b> | Glicose  | Ensaio UV enzimático                           |
| <b>Metabolismo do Ferro</b>                | Ferro  | Ensaio de cor fotométrico                      |
|  | Ferritina  | Imunoensaio turbidimétrico                     |
| <b>Metabolismo das Proteínas</b>           | Albumina<br>Proteínas Totais Séricas<br>Proteínas Totais Urinárias | Ensaio de cor fotométrico                      |
|  | Proteína C Reativa   | Imunoensaio turbidimétrico                     |
| <b>Metabolismo Mineral e Ósseo</b>         | Cálcio<br>Mágnésio   | Ensaio de cor fotométrico                      |
|  | Fosfato (Fósforo inorgânico)                                       | Ensaio UV fotométrico                          |
| <b>Função Cardíaca</b>                     | Creatina cinase<br>Lactato desidrogenase                           | Ensaio UV cinético                             |
| <b>Função Hepática</b>                     | Aspartato aminotransferase<br>Alanina aminotransferase             | Ensaio UV Cinético                             |
|  | Gama-Glutamiltransferase<br>Fosfatase Alcalina                     | Ensaio de cor cinético                         |
|  | Bilirrubina Direta<br>Bilirrubina Total                            | Ensaio de cor fotométrico                      |
| <b>Função Pancreática</b>                  | Amilase  | Ensaio de cor cinético                         |
| <b>Função Renal</b>                        | Ureia  | Ensaio UV Cinético                             |
|  | Creatinina   | Ensaio de cor cinético                         |
|  | Ácido Úrico  | Ensaio de cor enzimático                       |
|  | Microalbuminúria   | Imunoensaio turbidimétrico                     |
| <b>Doenças Auto-imunes</b>                 | Fator Reumatóide   | Imunoensaio turbidimétrico                     |
| <b>Doenças Infeciosas</b>                  | Anti-estreptolisina O  | Imunoensaio turbidimétrico                     |

Para além dos **Dimension RxL Max**, o **Minicap** da **Sebia** é outro dos equipamentos automatizados pertencentes ao setor da Bioquímica. Este permite realizar a eletroforese das proteínas séricas (EPS), um método semi-quantitativo que consiste na separação das proteínas do sangue, de acordo com o seu peso molecular e carga elétrica. Assim uma EPS resulta num gráfico com seis principais frações proteicas: albumina, alfa-1-globulina, alfa-2-globulina, beta-1-globulina, beta-2-globulina e gamaglobulina. Estas proteínas estão envolvidas em inúmeros processos bioquímicos importantes ao bom funcionamento do organismo. Alterações no perfil eletroforético podem significar doenças das mais variadas etiologias, no entanto as principais são as gamopatias monoclonais (Mieloma Múltiplo, Doença de *Waldenström*, entre outras), sendo este exame importante no seu diagnóstico e monitorização.

Neste setor laboratorial, há uma grande preocupação em manter os equipamentos calibrados e controlados para garantir que os resultados são fidedignos. Acaba por ser uma questão de grande importância, e por isso as amostras só são colocadas nos equipamentos depois destes estarem controlados e aptos a usar. Estes equipamentos encontram-se ligados a um servidor que transmite todos os parâmetros analíticos que têm de ser determinados, bem como o resultado dos mesmos.

---

## 4. IMUNOLOGIA

O setor de Imunologia do laboratório GS-CML Viseu é extremamente importante na determinação de parâmetros como marcadores tumorais, hormonas da reprodução, marcadores tiroideos, marcadores cardíacos e ainda marcadores de doenças infecciosas (imunoserologia). Mais uma vez, o principal produto biológico usado é o soro. Se a amostra já passou pelo setor de Bioquímica é sujeita a uma nova centrifugação a 3000 rpm, durante 10 minutos, com o objetivo de ficar mais límpida. Caso a requisição só tenha parâmetros imunológicos, depois da amostra ser triada, é centrifugada a 3000 rpm, durante 10 minutos e levada para o setor de Imunologia.

Assim como o setor de Bioquímica, o setor de Imunologia é igualmente muito automatizado, sendo os equipamentos aqui utilizados o **ADVIA® Centaur XP**, da **Siemens**, e o **mini VIDAS® Blue**, da **BioMérieux**. O **ADVIA® Centaur XP** é um equipamento que utiliza a quimioluminescência associada ao imunoensaio, como metodologia de análise. A luz emitida durante a reação quimioluminescente, será proporcional à quantidade de analito presente na



amostra. O marcador de quimioluminescência utilizado é o Éster de Acridina. O equipamento utiliza dois tipos de imunoensaio para a deteção de antígenos, assim como anticorpos:

- a) o imunoensaio do tipo Sandwich para a determinação de Antígeno Hbs, Anticorpo Hbs, Anticorpo HCV, Ca125, CEA, Ferritina, FSH, HIV, PSA, PSA livre e TSH;
- b) e imunoensaio Competitivo, na determinação de T3, FT3, FT4 e Vitamina B12.

O **mini VIDAS® Blue**, por sua vez, é um equipamento utilizado essencialmente em contexto de urgência. É um sistema automatizado de imunoensaio com base no princípio do Teste Imunoenzimático por Fluorescência. Todas as etapas de reação enzimática no imunoensaio são executadas automaticamente num espaço mínimo: pipetagem, incubação, lavagem, leitura, e os resultados são imediatamente enviados e impressos numa impressora integrada. A maioria dos parâmetros determinados são parâmetros de urgência, como a Troponina I, a Mioglobina, o NT-proBNP, a CK-MB (marcadores cardíacos), os D-dímeros e a Procalcitonina (marcador de sépsis). No entanto, também se determina parâmetros de rotina, como a gonadotrofina coriônica humana.

Ambos os equipamentos são sujeitos a calibrações e controlos. No que diz respeito às calibrações, são realizadas aquando de mudança de lote dos reagentes ou periodicamente quando pedido pelo equipamento. O controlo é feito diariamente, mas não em todos os parâmetros. Existe um mapa onde estão assinalados todos os controlos a fazer em cada dia. Para além dos controlos assinalados ficam sujeitos a controlo os parâmetros que sofrerem calibração.

A Serologia Infeciosa também faz parte do setor da Imunologia, no entanto ao contrário dos parâmetros anteriores, que eram determinados por equipamentos automatizados, os testes serológicos são essencialmente realizados de forma manual. Diferentes casas comerciais disponibilizam kits que vêm equipados com reagentes, controlos e bulas para diferentes determinações. Nestes casos em que o processamento é essencialmente manual, devem ser executadas com atenção todas as etapas, de forma a minimizar os erros humanos. Os principais testes serológicos realizados no laboratório GS-CML Viseu incluem:

- a) **Verenal Disease Research Laboratory** – teste de aglutinação, não treponémico, para o diagnóstico de sífilis. O reagente com combinação de lecitina, colesterol e cardiolipina possui semelhança imunológica com antígenos de *Treponema pallidum*, constituindo um antígeno não treponémico. A interação de anticorpos (reaginas) do soro do utente, com este antígeno irá levar à floculação que pode ser observada a olho nu;

- b) **Treponema pallidum Hemagglutination Assay** – teste de aglutinação, treponémico, mais específico e sensível para o diagnóstico de sífilis. Neste caso, o reagente usado contém eritrócitos sensibilizados com *T. pallidum* permitindo detetar anticorpos IgM e IgG específicos contra a bactéria;
- c) **Reação de Weil-Felix** – teste de aglutinação para o diagnóstico de infeções por *Rickettsia* spp. O reagente utilizado contém estirpes de *Proteus* spp. que possuem antígenos comuns às riquetsias. Assim, a adição do reagente, ao soro do utente, permitirá observar a aglutinação;
- d) **Reação de Paul-Bunnell** – teste de aglutinação para o diagnóstico de mononucleose infecciosa. Este teste pesquisa a presença de anticorpos heterófilos do tipo IgM no soro, produzidos em resposta ao vírus. Estes são capazes de aglutinar os eritrócitos de carneiro presentes no reagente;
- e) **Reação de Widal** - teste serológico presuntivo que permite detetar infeção por bactérias do género *Salmonella* (especialmente para deteção de febre tifóide e paratifóide). O teste consiste em verificar a aglutinação de anticorpos numa amostra de soro após a adição de uma pequena quantidade dos antígenos O-somático e H-flagelar contidos no reagente;
- f) **Reação de Rose-Bengal** – teste de aglutinação para o diagnóstico de brucelose. Os anticorpos anti-*Brucella* que eventualmente estiverem presentes no soro, vão reagir com a suspensão antigénica de *Brucella abortus* presente no reagente, e será observada a aglutinação macroscopicamente.

---

## 5. MICROBIOLOGIA

A Microbiologia desempenha um papel fundamental no estudo dos diferentes microrganismos (bactérias, fungos, parasitas, vírus) e da sua interação com o ser humano, focando a sua atenção naqueles que são patogénicos, no sentido de entender qual o mecanismo de doença e qual a terapêutica adequada [1].

Apesar de associarmos os microrganismos a estados de doença, a verdade é que possuímos uma microbiota, ou seja, uma comunidade de microrganismos que nos coloniza, variando de pessoa para pessoa e consoante o estado de saúde. Estes organismos desempenham um papel crucial no bom funcionamento do nosso metabolismo e sistema imunitário, prevenindo ainda a colonização do nosso corpo por agentes patogénicos. Qualquer desequilíbrio nesta comunidade, deixará o nosso corpo mais suscetível a que espécies indesejadas se multipliquem e causem infeção. Contudo, nem todos os microrganismos causam uma doença específica, podendo um único agente ter várias manifestações clínicas. Alguns são sempre patogénicos e outros só o são em certas circunstâncias (oportunistas). O desenvolvimento de uma infeção vai então depender de inúmeros fatores, incluindo a suscetibilidade do hospedeiro, a virulência do microrganismo, entre outros [1].

O objetivo do laboratório de microbiologia é conseguir identificar qual o microrganismo responsável pela infeção e qual a terapia mais adequada para a combater. Porém, nem sempre é uma tarefa fácil, uma vez que poderá haver contaminação com a microbiota do próprio organismo, tendo o microbiologista o papel de conseguir discriminar entre o que é valorizável e o que é comensal [1].

A qualidade das amostras que chegam a este setor é de extrema importância para o sucesso do diagnóstico. Estas devem ser colhidas adequadamente e transportadas no menor tempo possível, de modo a garantir a recuperação do microrganismo implicado. Uma boa colheita leva a uma melhor interpretação dos resultados, melhor evolução clínica do utente, diminuição do número de infeções hospitalares e ainda uma diminuição de custos associados [2].

De todos os setores do laboratório este é o menos automatizado e que exige um maior trabalho técnico. Desta forma, o risco de contaminação é muito grande e deverá ser colmatado com boas práticas laboratoriais no sentido de não pôr em causa o trabalho efetuado, nem a segurança do pessoal técnico.

---

## 5.1 MEIOS DE CULTURA

O diagnóstico microbiológico baseia-se na recuperação do agente causador da infeção, sendo feito um exame cultural onde as amostras são inoculadas em meios de cultura e sujeitas a condições de incubação específicas. Os meios de cultura podem ser líquidos, sólidos (com 1,5% de agar) ou semissólidos (com 0,5% de agar). Estes meios podem ainda ser: seletivos, ou seja, favorecem a deteção de determinados microrganismos, através da inibição do crescimento de outros por meio de certos aditivos (corantes, antibióticos); não seletivos, os quais permitem o crescimento da maioria dos microrganismos; e diferenciais, que através da adição de determinados substratos, permitem identificar presuntivamente e distinguir os microrganismos através da aparência que adquirem no meio (cor, formação de precipitados) [1]. Os meios de cultura utilizados no laboratório GS-CML Viseu incluem:

### Meios líquidos:

- **Caldo de selenito** - meio líquido de enriquecimento para *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* O selenito de sódio inibe a maioria das *Enterobacteriaceae* [3].
- **Caldo cérebro-coração (BHI)** - caldo extremamente rico e nutritivo que permite o crescimento de microrganismos exigentes.
- **Caldo Todd Hedwitt** - caldo de enriquecimento seletivo para estreptococos do grupo B;

### Meios sólidos:

- **Gelose chromID™ CPS® Elite (CPSE)** - Meio cromogéneo para o isolamento, contagem e identificação direta ou presuntiva de microrganismos de infeção do trato urinário.
- **Gelose chromID™ Strepto B (STRB)** - Meio cromogéneo seletivo utilizado para a deteção de *Streptococcus agalactiae* em mulheres grávidas.
- **Gelose MacConkey (MCK)** - meio seletivo e diferencial para isolamento de bacilos Gram negativo. Os sais biliares inibem o crescimento da maioria das bactérias Gram positivo. A presença de lactose permite diferenciar as bactérias fermentadoras das não fermentadoras deste açúcar [3].
- **Gelose Hektoen (HEKT)**- meio seletivo diferencial para o isolamento de *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* Os sais biliares inibem as bactérias Gram positivo e retardam o crescimento de algumas *Enterobacteriaceae* [3]. O tiosulfato de sódio e o citrato férrico amoniacal permitem detetar a produção de sulfureto de hidrogénio (H<sub>2</sub>S) [4].

- **Gelose *Campyloset* (CAM)** - Meio seletivo para a recuperação de *Campylobacter* spp.
- **Gelose *Columbia* + 5% de sangue de carneiro (COS)** - meio de isolamento especialmente desenvolvido para facilitar o crescimento de microrganismos exigentes. Adaptado à cultura da maior parte das espécies de bactérias, independentemente do seu metabolismo. Permite a observação da presença ou não de hemólise e o tipo de hemólise [3];
- **Gelose *Columbia* + 5% de sangue de carneiro suplementado com colistina e ácido nalidíxico (CNA)** – meio seletivo para bactérias Gram positivo. A presença de colistina e o ácido nalidíxico inibem o crescimento das *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* spp. Permite a observação da presença ou não de hemólise e o tipo de hemólise [3];
- **Gelose de Chocolate + PolyVitex (PVX)** - Meio usado na recuperação de microrganismos fastidiosos (*Neisseria* spp., *Haemophilus* spp., etc.); O sangue adicionado ao meio basal ainda quente leva à lise dos glóbulos vermelhos tornando o meio castanho e tornando disponível nutrientes intracelulares como o fator X (hemina) e V (NAD- Nicotinamida adenina dinucleótido) [3];
- **Gelose de Chocolate + PolyVitex VCAT3 (VCAT)** - Meio seletivo para *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*; Contém os fatores V e X e ainda um conjunto de antibióticos (vancomicina, colistina, anfotericina e trimetoprim) que inibe a maior parte das outras bactérias [3];
- **Gelose de Chocolate *Haemophilus* spp. (HAE2)** - meio seletivo para o isolamento de *Haemophilus* spp.. Contém os fatores V e X. A seletividade do meio é obtida através da combinação de agentes antimicrobianos e antifúngicos;
- **Gelose de Chapman (MSA2)** – Meio seletivo para *Staphylococcus* spp. O alto teor de cloreto de sódio no meio limita o crescimento de bactérias que não sejam *Staphylococcus* spp.. Microrganismos que fermentam manitol produzem colónias amarelas (permite identificação presuntiva de *Staphylococcus aureus*) [3];
- **Gelose de Sabouraud (SCG2)** - Meio seletivo para recuperação/isolamento de fungos (pH 5,5); Contém gentamicina e cloranfenicol que inibe o crescimento bacteriano [1];
- **Meio de Lowenstein Jensen** - Meio para isolamento de micobactérias; O verde malaquite inibe crescimento de outras bactérias que podem estar presentes na amostra [4].

---

## 5.2 PROVAS BIOQUÍMICAS

Os meios referidos anteriormente vão permitir a recuperação do possível agente causador da infeção, todavia, nem todos os meios são seletivos e muitas vezes cresce também microbiota associada ao local anatómico de onde foi feita a colheita. Nesse sentido, existem algumas provas manuais complementares que vão auxiliar no processo de identificação do microrganismo. As que estão disponíveis no laboratório GS-CML Viseu e que foram utilizadas ao longo do estágio são:

### ➤ **Prova da Catalase**

A catalase é uma enzima que permite a algumas bactérias (e outras células) remover o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) potencialmente prejudicial que se acumula no seu ambiente, transformando em água ( $H_2O$ ) e oxigénio ( $O_2$ ). Assim, a prova consiste em adicionar gotas de  $H_2O_2$  a uma colónia bacteriana e observar se há libertação de  $O_2$  sob a forma de bolhas. Isto indica a presença da enzima e dá-se o resultado como positivo [5].

### ➤ **Prova da Oxidase**

As enzimas citocromo-oxidases são hemoproteínas que atuam como elo final na cadeia de respiração aeróbia transferindo eletrões (hidrogénio) para o oxigénio, com formação de água. Para detetar a presença desta enzima, é retirada uma colónia bacteriana que vai ser colocada sobre papel de filtro com algumas gotas de reagente. Este reagente utiliza um corante que substitui o oxigénio como aceitador de hidrogénio, provocando o aparecimento de uma cor azul-púrpura na presença da enzima (positivo) [5].

### ➤ **Prova da Coagulase (*Pastorex*<sup>TM</sup> *Staph-plus*)**

Este é um kit comercial que o laboratório utiliza para uma deteção mais rápida de *Staphylococcus aureus* e é um método alternativo à prova da coagulase em lâmina. A maioria dos *S. aureus* produzem proteína A que tem afinidade específica para o fragmento Fc da imunoglobulina G. Assim, a prova consiste em partículas de latex revestidas de plasma humano contendo imunoglobulina G e fibrinogénio que vão reagir quer com o fator de aglutinação (*fator clumping*) quer com a proteína A, originando aglutinação que é visível a olho nu. Contudo há limitações, uma vez que bactérias pertencentes a outros géneros poderão gerar uma reação positiva, e por outro lado, algumas estirpes de *S. aureus* gerarem reação negativa [3].

### ➤ Prova de Sensibilidade à Optoquina

A espécie *Streptococcus pneumoniae* é geralmente sensível à optoquina, o que o distingue dos outros estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos. Assim, o aparecimento de um halo de inibição  $\geq 19$  mm à volta do disco de optoquina na superfície de uma placa semeada, é sugestivo da presença de *S. pneumoniae* [3].

---

## 5.3 EQUIPAMENTOS AUTOMATIZADOS

O setor de Microbiologia ainda é um setor muito manual, no entanto cada vez estão mais presentes equipamentos automatizados nos diversos setores, e este não é exceção. O seu bom uso tem inúmeras vantagens, nomeadamente a diminuição de erros inerentes à mão humana, a maior rapidez e também eficácia na obtenção dos resultados. Tudo isto traz benefícios incluindo permitir que o médico inicie a terapêutica adequada mais cedo, havendo uma melhor evolução clínica e, portanto, uma diminuição da taxa de mortalidade. Consequentemente, haverá menores tempos de internamento e menos gastos em tratamentos desadequados, trazendo benefícios também a nível económico.

---

### 5.3.1 BACTEC 9050

O **BACTEC 9050** é um dos equipamentos automatizados no setor da Microbiologia do laboratório GS-CML Viseu. Este consiste num sistema automatizado para detetar o crescimento microbiano em hemoculturas. À medida que os microrganismos presentes, metabolizam os substratos do meio de cultura, vão consumir  $O_2$ , e libertar  $CO_2$ . O  $CO_2$  que é libertado, é detetado por um sensor presente na garrafa, uma vez que a quantidade de luz que é absorvida pelo material fluorescente presente no sensor, é afetada pela concentração deste elemento. Os detetores vão então medir esta fluorescência, e um aumento nesta será proporcional à quantidade crescente de  $CO_2$  no meio ou à diminuição da quantidade de  $O_2$ . O equipamento agita continuamente as garrafas, rodando-as para serem lidas por um de três detetores. O aparelho monitoriza o sensor de cada garrafa de 10 em 10 minutos, ou seja, 144 vezes por dia. O tempo de incubação é de 7 dias a uma temperatura de  $37^\circ C$  e ao fim deste tempo as culturas são consideradas negativas. A maior parte dos microrganismos significativos são detetados nas primeiras 48h, sendo emitido um sinal sonoro pelo aparelho para avisar da eventual presença de microrganismos viáveis [6].

---

### 5.3.2 VITEK 2 COMPACT

O **VITEK 2 COMPACT** é outros dos aparelhos automatizados do setor da Microbiologia e é utilizado para identificação microbiana e realização de testes de suscetibilidade antimicrobiana (TSA), em microrganismos isolados de amostras clínicas. O sistema opera com cartas com códigos de barras, assegurando uma completa rastreabilidade e minimizando o risco de erros de transcrição. As cartas destinadas à identificação dos microrganismos contêm substratos bioquímicos e um poço de controle de crescimento, além de marcadores de resistência, proporcionando a identificação rápida e precisa a nível de espécie de mais de 350 bactérias e leveduras clinicamente relevantes. Já as cartas destinadas ao TSA, contêm poços impregnados com antibióticos onde se determina a Concentração Mínima Inibitória (CMI).

Para a utilização destas cartas é necessário preparar uma suspensão bacteriana a partir de colónias puras, em 3mL de solução salina (0,85% NaCl) com uma turvação equivalente a 0,5-0,65 *McFarland*. A escolha adequada das cartas de identificação e TSA é fulcral para se obter bons resultados, sendo que para a identificação de bactérias de Gram negativo são usadas as cartas *VITEK 2 GN* e para a identificação de bactérias de Gram positivo as cartas *VITEK 2 GP*. Após a escolha, estas são inseridas no aparelho e carregadas através de um sistema de vácuo, sendo posteriormente seladas e colocadas num carrossel de incubação. É através de um sistema ótico que o equipamento executa a análise de identificação e sensibilidade, através da monitorização contínua do crescimento e da atividade dos microrganismos no interior das cartas. Nas cartas para identificação o aparelho faz uma leitura automática, por espectrofotometria, da alteração de cor promovida pela mudança de pH devido ao metabolismo microbiano. Depois o equipamento compara os resultados com uma base de dados tentando encontrar um microrganismo com o mesmo padrão de resultados do que queremos identificar, dando uma probabilidade da sua identificação estar ou não certa. Nas cartas para TSA o sistema ótico baseia-se na medida da transmitância utilizando luz visível, sendo feitas leituras em intervalos de 15 minutos, que medem o crescimento dos organismos através da quantidade de luz transmitida através do poço [2] [4]. O TSA é emitido não só por categorias (sensível (S), intermediário (I) ou resistente (R)), mas também com a indicação da CMI de cada fármaco. Além disso, os principais mecanismos de resistência bacteriana são detetados e sugeridos. Isto vai permitir auxiliar os médicos na escolha de dosagens mais adequadas e eficazes para o tratamento do utente. Os resultados são depois interpretados de acordo com as normas da *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)*.



---

## 5.4 AMOSTRAS BIOLÓGICAS E SEU PROCESSAMENTO

Ao chegarem ao laboratório e antes do seu processamento, todas as amostras biológicas passam por um exame macroscópico, onde se verifica qual a análise pedida, se a colheita foi feita no recipiente correto e se a requisição é do utente ao qual pertence aquela amostra.

Todas as amostras devem ser colhidas antes de iniciada qualquer terapêutica antibiótica, para que não se verifique inibição do crescimento do agente patogénico. A colheita deve ser efetuada em condições de esterilidade, de modo a que o produto biológico não seja contaminado, pelo que se torna necessária a descontaminação da superfície corporal e a utilização de instrumentos de colheita estéreis. Para além disto, a amostra deve ainda ser representativa do processo infeccioso e a quantidade deve ser adequada. Durante o transporte, a amostra deve ser conservada o mais possível no seu estado original e sem deterioração significativa, mantendo a viabilidade dos microrganismos [3].

No laboratório GS-CML Viseu, as amostras biológicas recebidas com maior frequência no setor da Microbiologia são a urina e as fezes, seguindo-se o exsudado vaginal. Com menor frequência chegam também pús/exsudado de feridas, exsudado uretral, secreções do trato respiratório e garrafas para hemocultura. O processamento de cada uma destas amostras será descrito de seguida.

---

### 5.4.1 URINA

O aparelho urinário é estéril em todo seu trajeto, com exceção do terço terminal da uretra, onde se encontram bactérias oriundas do períneo. Além disso a urina com osmolaridade extremamente elevada e pH ácido (entre 5 e 7), também inibem o crescimento bacteriano [4]. Quando microrganismos alcançam outras áreas do trato urinário (via ascendente ou via hematogénea) e através de diversos fatores de virulência, conseguem colonizar e invadir os tecidos, desencadeia-se a infeção do trato urinário (ITU). Estas infeções podem ocorrer ao nível do trato urinário inferior, sendo a cistite a mais comum e podem também atingir o parênquima renal, sendo designadas de pielonefrites. Particularmente as mulheres são mais vulneráveis, sobretudo porque possuem menor extensão anatómica da uretra do que os homens, e maior proximidade entre a vagina e o ânus. Além disso os fluidos prostáticos presentes na urina dos homens têm atividade bactericida, e, portanto, constituem outro fator para uma menor vulnerabilidade destes [2].

Os agentes etiológicos frequentemente associados a ITU nas crianças e adultos, são as Enterobactérias, em particular: *Escherichia coli* (a mais comum), *Proteus* spp., *Klebsiella* spp. *Enterobacter* spp. e *Citrobacter* spp.; e ainda outras bactérias Gram-negativas, como a *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e algumas Gram-positivas, como *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus* ou *Staphylococcus aureus* [2].

A colheita da amostra para o diagnóstico laboratorial destas infeções, pode ser feita pelo utente colhendo a primeira urina da manhã, dado que é a mais concentrada. O utente deve rejeitar a primeira porção da micção e recolher para contentor estéril o jato intermédio, descartando o restante. É importante evitar a contaminação com a microbiota normal da zona vaginal, perianal e uretral [3]. Posteriormente, o processamento divide-se em duas partes: exame sumário da urina (urina do tipo 2) e exame bacteriológico (urocultura). O exame sumário da urina é realizado no equipamento **AUTION MAX AX-4280**, que usa tiras reagente para avaliar alguns parâmetros bioquímicos, como glicose, proteínas, pH, presença de sangue, leucócitos, nitritos, entre outros. Após essa análise, as amostras são centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos, são decantadas e procede-se à observação do sedimento urinário ao microscópio ótico. O objetivo é avaliar a presença de elementos figurados como leucócitos, eritrócitos, bactérias, elementos leveduriformes, células epiteliais, cilindros, entre outros, e reportar a sua presença com uma estimativa do número por cada campo. O exame bacteriológico da urina (urocultura) tem início com a homogeneização da amostra que é depois semeada com uma ansa de 1 µL na gelose CPSE e incubada em aerobiose, 37°C, durante 18-24h, podendo este tempo de incubação ir até às 48h. Este meio é diferencial, permitindo-nos uma identificação direta de *Escherichia coli*, cujas colónias são avermelhadas, e identificação presuntiva de outras enterobactérias. Permite ainda uma análise semi-quantitativa, sendo consideradas positivas as culturas com um ou dois microrganismos com um número igual ou



**Figura 1** – Gelose CPSE de urocultura positiva com *Escherichia coli* (fonte: Laboratório GS-CML Viseu).

superior a  $10^5$  UFC/ml (unidades formadoras de colónias) (Figura 1). Contudo, a valorização do eventual crescimento microbiano, vai depender não só da observação macroscópica das colónias, como também do exame sumário da urina feito anteriormente.

Uma cultura pura de pelo menos  $10^3$  UFC/mL, cujo sedimento urinário apresente leucócitos, raras células epiteliais e eventualmente bacteriúria, são critérios para valorizar e considerar a urocultura positiva. Por outro lado, um crescimento muitas vezes polimicrobiano, cujo sedimento apresente muitas células epiteliais,



**Figura 2** – Gelose CPSE de urocultura com crescimento polimicrobiano (fonte: Laboratório GS-CML Viseu).

mesmo com presença de leucócitos, é bastante sugestivo de contaminação, muitas vezes associado a uma má colheita da amostra. Neste caso, o crescimento não é valorizado, dando a urocultura como polimicrobiana, a valorizar pela clínica (Figura 2). Em caso de pouco ou nenhum crescimento, a urocultura é negativa e o processo termina. Existem outras situações cuja avaliação e interpretação dos resultados deve ser feita de acordo com o tipo de utente em causa, tendo em atenção o método de colheita e a informação clínica do utente.

A partir das uroculturas positivas procede-se então à identificação e TSA, à exceção da *E. coli*, para a qual apenas é realizado o TSA.

### **✚ Pesquisa de *Streptococcus pneumoniae* e *Legionella pneumophila***

No laboratório GS-CML Viseu, as amostras de urina são ainda utilizadas para a pesquisa de *Streptococcus pneumoniae* e *Legionella pneumophila*. Estes exames são pedidos essencialmente em contexto de urgência para um despiste e diagnóstico rápido de uma possível infeção respiratória, uma vez que estes dois microrganismos são agentes etiológicos de pneumonia.

O **BinaxNOW®** *Streptococcus pneumoniae* da **Alere** é um ensaio imunocromatográfico de membrana utilizado para detetar os antígenos solúveis de *S. pneumoniae* na urina de doentes infetados. O **BinaxNOW®** *Legionella* é igualmente um ensaio imunocromatográfico de membrana, mas neste caso utilizado para detetar o antígeno solúvel de *Legionella pneumophila* serogrupo I na urina humana.



**Figura 3** - BinaxNOW® *Streptococcus pneumoniae* e BinaxNOW® *Legionella* com resultado negativo (fonte: Laboratório GS-CML Viseu)

Um resultado negativo nestes testes (Figura 3), não exclui completamente a infeção por estes microrganismos.

---

## 5.4.2 FEZES

O trato gastrointestinal possui diversos mecanismos de defesa impedindo que os microrganismos que ingerimos através dos alimentos e/ou água possam causar infecção. O pH ácido do estômago e do duodeno, a microbiota intestinal, o peristaltismo, a presença de mucinas e a secreção de IgA pela mucosa intestinal, constituem os principais mecanismos que inibem o desenvolvimento de microrganismos potencialmente patogênicos. Contudo, há microrganismos que através de diversos fatores de virulência, são capazes de sobreviver e escapar às defesas do organismo causando as principais infecções do trato gastrointestinal, as gastroenterites [4] [5].

### Exame Bacteriológico de Fezes (Coprocultura)

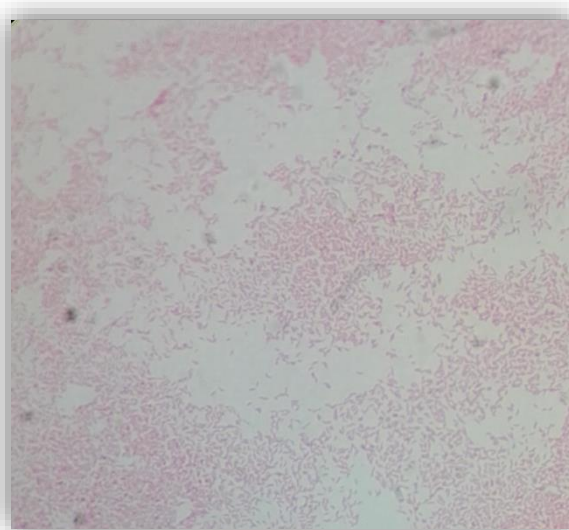
A coprocultura é pedida por rotina para o despiste de *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Campylobacter spp*, que são alguns dos principais agentes etiológicos das gastroenterites de origem bacteriana. A transmissão ocorre principalmente pela ingestão de alimentos ou água contaminados. O mecanismo de patogenicidade passa pela capacidade destas bactérias, através de diversos fatores de virulência, invadirem as células epiteliais da mucosa intestinal e em alguns casos da submucosa, gerando uma inflamação com possível aparecimento de muco, leucócitos e sangue nas fezes [5].

Para o diagnóstico laboratorial destas infecções, são colhidas pelo utente até um total de 3 amostras de fezes (dejeções diferentes), sendo que nos casos agudos uma amostra é quase sempre suficiente [3]. Após receção no laboratório, a primeira etapa do processamento passa pelo exame macroscópico no sentido de observar a consistência das fezes, a presença de sangue e/ou muco. De acordo com o que se observa, são retiradas, pequenas porções de cada amostra para 1 ml de solução salina. A partir desta mistura, são feitos dois esfregaços, um destinado à coloração de Gram e outra à coloração de *Wright* (avaliar a presença de células, leucócitos, nomeadamente polimorfonucleares, e eritrócitos).

Ainda a partir da mistura das fezes em solução salina, são inoculadas as geloses MCK e CAM. Por último, a partir da(s) amostra(s) de fezes, são retiradas com uma ansa pequenas porções de cada uma, desta vez para o caldo de selenito. A gelose MCK e o caldo de selenito são incubados na estufa em atmosfera de aerobiose, a 35°C, durante 18 a 24 horas. Já a gelose CAM é incubada em atmosfera de microaerofilia (5% de O<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub>, e 85% de N<sub>2</sub>), a

42°C, durante 48 a 72 horas. Após as 24h é efetuada a partir do caldo, a subcultura para o meio sólido HEKT, sendo este incubado em aerobiose, a 35°C, durante 18 a 24h.

A leitura das placas é feita normalmente às 48h. Na gelose MCK o crescimento de colónias cor de rosa (fermentadoras da lactose) irão aparecer como resultado do crescimento da microbiota intestinal associada. Neste meio, serão de especial atenção, colónias incolores (não fermentadoras da lactose) que poderão ser sugestivas de *Shigella spp.* e *Salmonella spp.* Na gelose HEKT, colónias verdes são sugestivas de *Shigella spp.*, enquanto que colónias azul-esverdeadas, com ou sem centros pretos (produção de H<sub>2</sub>S) são sugestivas de *Salmonella spp.* [5]. Na presença de pelo menos uma destas colónias, uma repicagem para nova gelose HEKT é realizada a fim de obter colónias isoladas, e posteriormente confirmar se há critérios para avançar ou não. Por último, na gelose CAM, caso haja crescimento, é realizada a prova da oxidase e da catalase. Se ambas forem positivas é sugestivo da presença de *Campylobacter spp.* A coloração de Gram a partir de uma colónia isolada (Figura 4), poderá ser feita com o objetivo de visualizar bacilos de Gram negativo em forma de S ou em espiral, descrito como uma morfologia em “asa de gaivota”, aspeto característico de *Campylobacter spp.* [5]. Toda a interpretação e valorização clínica das placas, está sempre dependente daquilo que o Patologista Clínico observa nos esfregaços e da informação clínica do utente.



**Figura 4** – Observação microscópica (objetiva 100x) de coloração de Gram feita a partir de colónias isoladas da gelose CAM. Presença de bacilos de Gram negativo com morfologia “asa de gaivota” sugestivo de *Campylobacter spp.* (fonte: Laboratório GS-CML Viseu).

## Pesquisa de *Clostridium difficile*

O *Clostridium difficile* é uma bactéria comensal do trato gastrointestinal, que coloniza o cólon em cerca de 3% dos adultos saudáveis e em 10-30% dos doentes hospitalizados. Em condições normais, a microbiota intestinal inibe o crescimento de *C. difficile*. No entanto, quando o equilíbrio da microbiota intestinal é alterado por intermédio de antibióticos, o *C. difficile* encontra as condições propícias à sua germinação, colonização e segregação de toxinas, sendo responsável por cerca de 30% das diarreias associadas ao uso de antibióticos. As estirpes toxigénicas produzem uma enterotoxina, a toxina A, e uma citotoxina, a toxina B, que

conduzem a uma colite pseudomembranosa. Além disso, todas as estirpes de *C. difficile* produzem em grandes quantidades a enzima glutamato desidrogenase (GDH) [7]. Nesse sentido, quer as toxinas, quer a GDH são bons marcadores da presença desta bactéria em amostras de fezes.

O laboratório GS-CML Viseu, utiliza o teste **TECHLAB® C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®** que é um ensaio imunoenzimático rápido de membrana que permite a deteção simultânea do antígeno GDH e das toxinas A e B do *Clostridium difficile* num único poço de reação.

## Exame Parasitológico de Fezes

As parasitoses intestinais são infeções do trato gastrointestinal causadas por parasitas. Embora estes organismos tenham diminuído nos últimos anos, devido à melhoria de condições sanitárias, continuam a ter um peso importante nos distúrbios gastrointestinais, sendo que as crianças, indivíduos imunodeprimidos e viajantes que regressam de países com piores contextos sanitários, são os grupos mais afetados [4].

Os principais agentes etiológicos das parasitoses intestinais são *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Cystoisospora belli*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Strongyloides stercoralis*, *Ancylostoma* e *Necator spp* e *Enterobius vermicularis* [2].

A colheita de fezes para a realização deste exame deverá ser de três amostras em dias não consecutivos, tendo em conta a eliminação intermitente de certos parasitas [4]. Uma vez rececionadas as amostras, estas passam por um exame macroscópico, onde se observa a sua textura, a cor e a eventual presença de muco, sangue ou existência de parasitas ou fragmentos de estruturas parasitárias macroscópicas. O diagnóstico das parasitoses baseia-se principalmente na deteção microscópica da morfologia de diversas estruturas parasitárias (quistos, trofozoítos, ovos ou larvas) sendo fulcral conhecer os seus ciclos de vida, de modo a ter conhecimento de quais as formas que poderão aparecer na amostra a analisar [2]. Este exame microscópico realiza-se após um método de concentração, que se baseia no princípio de sedimentação. No laboratório GS-CML Viseu é utilizado um kit para a execução deste método. Consiste num pequeno tubo cónico contendo uma solução de formalina a 10%, que funciona como meio de conservação, onde são colocados pedaços das três amostras, sendo adicionado de seguida um solvente de lípidos, o acetato de etilo. O kit traz outro tubo cónico para onde se transfere a mistura anterior, e o filtro nele inserido, retém as partículas de maiores dimensões que não se dissolvem. A mistura filtrada vai a centrifugar a 1500 rpm

durante 10 min, obtendo-se um sedimento mais limpo, com os elementos parasitários em maior concentração, livre de todos os resíduos lipídicos [4]. Para melhorar a observação microscópica, utiliza-se o lugol como corante que é adicionado à mistura. De seguida, coloca-se uma gota da mistura entre lâmina e lamela, e é feita a observação microscópica primeiramente com a objetiva de 10x e depois com a de 40x (Figura 5), sendo fulcral que toda a lâmina seja visualizada [2].



**Figura 5** – Observação microscópica (objetiva 40x) de ovo fértil de *Ascaris Lumbricoides* em amostra de fezes (fonte: Laboratório GS-CML Viseu).

### Pesquisa de Adenovírus e Rotavírus

Muitas gastroenterites apresentam origem viral sendo os agentes etiológicos mais comuns, os vírus Adenovírus e Rotavírus. Estes últimos, são a causa mais comum de diarreia em crianças com menos de 5 anos, causando cerca de 130 milhões de episódios de diarreia por ano em todo o mundo [4].

Estes vírus entéricos infetam células das vilosidades do intestino delgado, levando à atrofia epitelial e proliferação de células com capacidade secretora. Essas alterações podem diminuir a capacidade de absorção do intestino e aumentar a quantidade de água e eletrólitos intestinais no lúmen, o que resulta em diarreia [4]. A principal via de transmissão é fecal-oral [5].

O laboratório GS-CML Viseu dispõe de um teste imunocromatográfico para a deteção destes dois vírus em amostras fecais.

---

### 5.4.3 EXSUDADO VAGINAL

A microbiota da vagina apresenta uma grande variedade de bactérias e leveduras, mas principalmente *Lactobacillus spp.*, bacilos Gram-positivo, que exercem um efeito protetor sobre a mucosa vaginal. Estas bactérias metabolizam o glicogénio das células epiteliais vaginais, em ácido láctico, criando um ambiente ácido que é inibidor para muitos organismos. Algumas estirpes são ainda capazes de produzir peróxido de hidrogénio que também dificulta a proliferação de microrganismos [4] [5].

Um desequilíbrio da microbiota vaginal está relacionado com a diminuição de *Lactobacillus spp.*, quer pelo fator idade, alterações hormonais ou devido ao uso excessivo de antibioterapia. Esse desequilíbrio vai permitir que certos microrganismos já presentes na microbiota (oportunistas), proliferem e causem infeção. É o caso da *Gardnerella vaginalis*, que leva a vaginoses bacterianas, e de *Candida spp.*, que leva a candidíases. Outros microrganismos não pertencentes à microbiota vaginal podem provocar infeções vaginais, tais como: *Neisseria gonorrhoeae* (gonorreia), *Haemophilus ducreyi* (cancróide) ou *Trichomonas vaginalis* (tricomoníase) [4] [5].

Para o diagnóstico laboratorial destas infeções, os exsudatos vaginais são colhidos com zaragatoas secas e colocadas em meio de transporte de Stuart ou Amies com carvão. Diretamente com a zaragatoa fazem-se três esfregaços: um para a preparação a fresco, outro para a coloração de Gram e o último para a coloração de *Wright*. A preparação a fresco tem como objetivo observar a presença de trofozoítos flagelados de *Trichomonas vaginalis* e/ou elementos leveduriformes. A coloração de Gram possibilita uma avaliação da presença ou ausência de flora bacteriana (tipo e eventual predomínio), e das “clue cells”. Estas são células epiteliais de descamação repletas de bacilos de reação de Gram variável, sugestivas de infeção por *G. vaginalis*, quando associadas a ausência ou diminuição de *Lactobacillus spp.* (bacilos grandes de Gram-positivo) [4]. Por último, a coloração de *Wright* permite avaliar a presença de leucócitos, nomeadamente polimorfonucleares, de eritrócitos e outras células. Para o exame cultural, é feita uma suspensão da zaragatoa em solução salina e a partir daí são inoculados os meios de COS, PVX, VCAT (atmosfera de 5 a 7 % de CO<sub>2</sub> a 35-37°C, durante



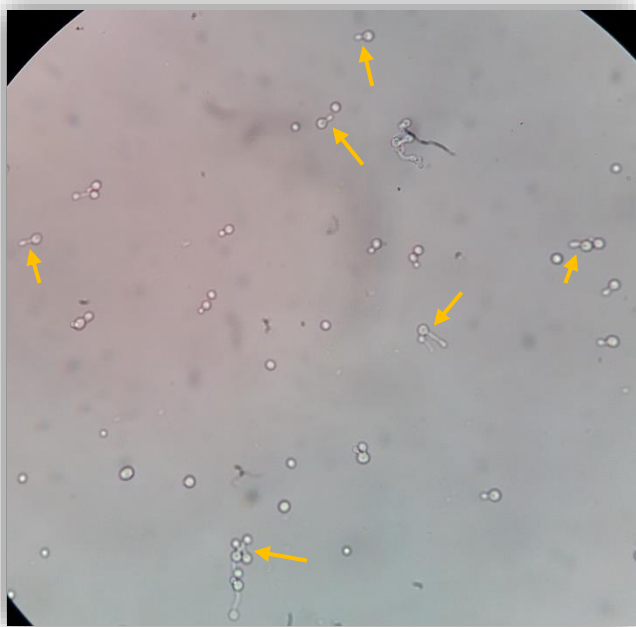
48 horas) e SCG2 (aerobiose a 35-37°C, durante 48 horas). A observação das placas deve ser feita a cada 24h.

No meio SCG2 o crescimento de colónias redondas de cor branca (Figura 6) é de especial atenção, e em alguns casos vem corroborar a prévia observação de elementos leveduriformes no exame a fresco. Nestes casos, o laboratório executa de seguida a prova da filamentação/teste da blastese. Consiste na suspensão de uma colónia isolada do meio SCG2, em 0,5 mL de uma amostra de soro humano, que vai a

incubar a 37°C durante 2,5 a 3 horas. Após este tempo, a observação microscópica, entre lâmina e lamela, da presença do tudo germinativo sem formar constrição com a célula-mãe (Figura 7), permite a identificação presuntiva de *Candida albicans* [4]. No resto dos meios, a valorização clínica do eventual crescimento, deve ser efetuada de acordo com a informação



**Figura 6** – Gelose SCG2 com colónias sugestivas de *Candida* spp. (fonte: laboratório GS-CML Viseu).



**Figura 7** - Observação microscópica (objetiva 40x) após prova da filamentação com elementos leveduriformes sugestivos de *Candida albicans* (fonte: Laboratório GS-CML Viseu). Observa-se tubo germinativo sem contração com a célula mãe (Setas).

clínica e com as observações feitas, no exame direto, pelo Patologista Clínico. Cabe a este, saber distinguir os microrganismos potencialmente patogénicos, daqueles que fazem parte da microbiota, para posteriormente se identificar e reportar apenas os que têm significância clínica.

## ✚ Pesquisa de *Streptococcus* do Grupo B

Este exame bacteriológico tem especial interesse em mulheres grávidas para detetar a provável colonização da mucosa vaginal/anal por *Streptococcus agalactiae*. A presença deste coco de Gram positivo durante a gravidez é importante, já que, durante o parto, pode ocorrer transmissão vertical causando pneumonia, septicémia, ou meningite no recém-nascido [1]. Por este motivo, no 3º trimestre de gravidez, entre a 34ª e 37ª semana de gravidez, faz-se a recolha de zaragoas vaginais e anais. Estas são inoculadas no meio de enriquecimento *Todd Hewitt*, a 37°C, durante 24 horas, após as quais é efetuada a subcultura para o meio sólido STRB, incubado a 37°C em atmosfera de 5 a 7 % de CO<sub>2</sub>, durante 48 horas. A observação de colónias redondas com coloração rosa pálido a vermelho, permite dar o resultado como positivo (Figura 8).

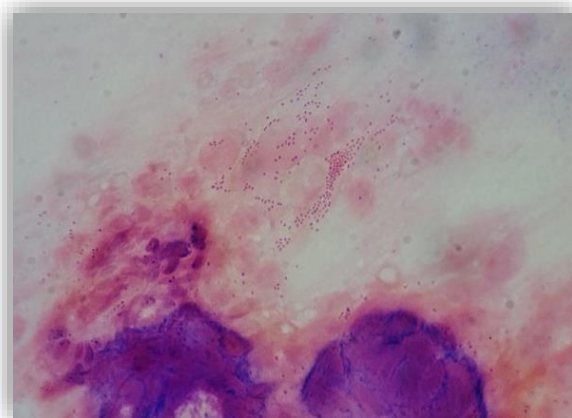


**Figura 8** – Gelose STRB com colónias de *Streptococcus agalactiae* (fonte: Laboratório GS-CML Viseu).

#### 5.4.4 EXSUDADO URETRAL

A uretra anterior masculina é normalmente colonizada por um pequeno número de microrganismos. A inflamação na uretra (uretrite), associada a microrganismos que causam doenças sexualmente transmissíveis, é a causa mais comum reconhecida em homens. Estas uretrites infecciosas podem ser divididas em gonocócicas, causadas por *Neisseria gonorrhoeae*, e em não gonocócica, causadas mais frequentemente por *Chlamydia trachomatis* e com menor frequência por *Ureaplasma spp.*, *Mycoplasma spp.* e *Trichomonas vaginalis* [4].

Para o diagnóstico laboratorial destas infeções, os exsudados uretrais são colhidos com zaragatoa apropriada, preferencialmente antes da 1ª micção. Caso não seja possível, deve-se esperar pelo menos uma hora após a última micção [3]. As condições de transporte são as mesmas dos exsudados vaginais. A primeira etapa do processamento pela pelo exame direto, em que são feitos os esfregaços, um para a coloração de Gram (verificar a predominância de algum tipo morfológico) e outro para a coloração de Wright (visualizar células, leucócitos e/ou eritrócitos). No exame cultural são inoculados os meios PVX e VCAT, que vão incubar em atmosfera de 5 a 7 % de CO<sub>2</sub> a 35-37°C, durante 48 horas. A observação das placas deve ser feita a cada 24h. Na meio VCAT o crescimento de colónias pequenas, elevadas e translúcidas é sugestivo de *Neisseria gonorrhoeae*. O teste da oxidase deve ser feito de seguida, que no caso deste microrganismo será positivo. A observação e interpretação do Gram é de extrema importância nestas situações, uma vez que a presença de numerosos leucócitos polimorfonucleares e diplococos de Gram negativo intra e extracelulares (Figura 9), é uma forma bastante sensível e específica de diagnosticar gonorreia em homens sintomáticos (secreção uretral purulenta) [4]. Nas mulheres, a existência de microrganismos morfológicamente semelhantes a *N. gonorrhoeae* na microbiota vaginal, tornam o exame direto menos sensível, sendo fácil confundir um microrganismo comensal com um patogénico [5].



**Figura 9** - Observação microscópica (objetiva 100x) de esfregaço de exsudado uretral corado com coloração de Gram. Presença de leucócitos polimorfonucleares com diplococos de Gram negativo intra e extracelulares (fonte: Laboratório GS-CML Viseu).

---

## 5.4.5 PUS DE FERIDAS E ABCESSOS

A pele é a primeira linha de defesa do corpo contra a invasão microbiana. Como barreira física dinâmica, a pele sofre continuamente a renovação das células epiteliais, removendo substâncias e também microrganismos potencialmente patogênicos da sua superfície. Além disso, a pele é colonizada por uma variedade de microrganismos residentes que desempenham uma função protetora. A elevada concentração de sal e a presença de lisozimas também inibem a proliferação de microrganismos patogênicos. No entanto, uma ruptura nesta barreira pode permitir que a microbiota ou outros microrganismos não residentes, entrem e causem infecção. Contudo, categorizar as infecções da pele e dos tecidos moles torna-se problemático porque algumas podem envolver mais de uma estrutura (pele, tecido subcutâneo, fáscia, músculo), e diferentes microrganismos podem produzir infecções com as mesmas manifestações clínicas [4]. Assim, torna-se importante saber o local da infecção, a história clínica, nomeadamente dados epidemiológicos, o tipo de infecção (abcedada ou não) e o modo de colheita [3]. Ainda assim, os principais agentes etiológicos são *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus* (associados a piodermas) *Staphylococcus coagulase negativa*, *Enterococcus spp* e *Pseudomonas aeruginosa* [1].

As amostras para o diagnóstico laboratorial destas infecções, podem chegar ao laboratório como, exsudados de feridas colhidos com zaragatoa e colocados em meio de Stuart ou Amies; ou então, no caso de serem amostras de pus ou abcesso, podem chegar em frascos ou seringas esterilizados e fechados (não inviabilizar eventuais anaeróbios) [3]. O processamento das zaragatoas passa pelo exame direto, com realização de esfregaço para coloração de Gram, e pelo exame cultural, inoculando as geloses MCK (incubado em aerobiose a 37°C, durante 24 horas) e CNA (incubado em atmosfera de 5 a 7 % de CO<sub>2</sub> a 35-37°C, durante 48 horas). Por outro lado, nas amostras de pus e/ou abcessos são efetuados os dois esfregaços habituais, um para a coloração de Gram, e outro para a coloração de Wright (avaliar a presença de células e leucócitos, nomeadamente polimorfonucleares); e efetuado o exame cultural com inoculação dos meios sólidos MCK (incubado em aerobiose a 37°C, durante 24 horas), PVX e CNA (incubados em atmosfera de 5 a 7 % de CO<sub>2</sub> a 35-37°C, durante 48 horas) e do meio de enriquecimento BHI. Este último, se apresentar turvação às 24h, deve ser repicado para os mesmos meios sólidos utilizados.

A leitura e interpretação das placas deve ter em conta o local e o tipo de colheita, uma vez que as amostras colhidas com zaragatoas têm maior probabilidade de estar contaminadas com microrganismos comensais do local. Estes acabam por crescer nos meios inoculados, mas não são clinicamente valorizáveis. Este fator também deve ser levado em conta pelo Patologista

Clínico aquando da observação microscópica dos esfregaços. Os testes complementares de identificação são também um recurso importante nestas situações. A prova da catalase, efetuada a partir de colónias que eventualmente cresçam na gelose CNA, vai permitir distinguir os estreptococos, catalase negativos, dos estafilococos, catalase positivos. Neste meio também é possível observar a presença dos tipos de hemólise característicos de alguns microrganismos associados a estas infeções (Figura 10). A presença de beta-hemólise e prova da catalase positiva, poderá ser sugestivo de *S. aureus*. Adicionalmente, poderá ser feito o teste rápido de aglutinação em lamela (**PASTOREX™ STAPH-PLUS**), cuja observação de aglutinação irá corroborar a suspeita. No caso de colónias com beta-hemólise mas catalase negativa, poderá ser sugestivo de *S. pyogenes* [1]. Nestas situações, um esfregaço para coloração de Gram a partir das colónias isoladas, será importante para verificar a conformação dos cocos. No final, a identificação bacteriana e respetivo TSA devem ser feitos a partir das colónias valorizadas.



**Figura 10** – Gelose CNA com crescimento de colónias com beta-hemólise (fonte: Laboratório GS-CML Viseu).

---

## 5.4.6 AMOSTRAS DO TRATO RESPIRATÓRIO

O trato respiratório apresenta muitos mecanismos naturais que os microrganismos inalados têm de atravessar antes de poder causar infecção. Essas barreiras consistem nos pêlos nasais, as células mucociliares que revestem as superfícies mucosas, a microbiota da oro e nasofaringe, imunoglobulinas secretoras (IgA), defensinas e células inflamatórias fagocíticas. Os reflexos como a tosse, o espirro e o ato de engolir, também são mecanismos que evitam o acesso dos microrganismos ao trato respiratório inferior. As alterações nestas barreiras permitem que microrganismos potencialmente patogênicos sejam capazes de se estabelecer e causar infecção [4].

### Exsudado faríngeo: pesquisa de *Streptococcus* do grupo A

A maioria das infecções faríngeas ocorre no inverno e no início da primavera. O aumento do contato pessoa a pessoa durante estas estações favorece a transmissão dos agentes causadores, que são geralmente adquiridos pela contaminação das mãos com posterior inoculação do trato respiratório superior. O agente bacteriano mais comum de faringite e amigdalite é *Streptococcus pyogenes*, um coco de Gram positivo pertencente ao grupo A de Lancefield (beta hemolítico). Esta infecção surge com mais frequência em crianças entre os 5 e os 15 anos [4].

O principal objetivo dos testes laboratoriais na maioria dos casos de faringite aguda, passa por diferenciar a faringite estreptocócica dos casos mais comuns de faringite viral. Para isso deve ser colhida uma zaragatoa na zona da faringe posterior e na área das amígdalas, tocando também no exsudato se este estiver presente. A língua e outras estruturas orais devem ser evitadas no sentido de minimizar a contaminação com microbiota oral e a diluição da amostra [4].

No laboratório de estágio o exame para a detecção de *Streptococcus* do grupo A, é um teste rápido pedido em contexto de urgência que se baseia num método imunocromatográfico, e deteta qualitativamente o antígeno estreptocócico do grupo A. O resultado é obtido em apenas cinco minutos e é dado como positivo ou negativo.

## Exsudado nasal

As zaragatoas de exsudados nasais chegam ao laboratório com duas finalidades: **a)** pesquisa de *Staphylococcus aureus* metilina resistentes (MRSA); **b)** despiste de portadores de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*.

**a)** A pesquisa de MRSA é de extrema importância dado o aumento deste tipo de bactérias resistentes a uma elevada gama de antibióticos. Assim, torna-se imprescindível localizar hospedeiros e tentar erradicar a bactéria. As pessoas colonizadas têm maior probabilidade de desenvolver infecções provocadas por este microrganismo após procedimentos cirúrgicos, muitas das vezes com consequências graves apesar das terapias. Por este motivo, este exame é pedido muitas vezes em contexto de pré-operatórios. O processamento passa pela suspensão da zaragatoa em solução salina com posterior inoculação, por espalhamento, em gelose MSA2 e colocação de disco de cefoxitina. O meio vai a incubar a 37°C em atmosfera de aerobiose durante 24 a 48h. A mudança de coloração do meio para amarelo é sugestiva de *S. aureus*, uma vez que esta bactéria fermenta o manitol [5]. A resistência deve ser avaliada pela observação do halo de inibição em torno das eventuais colónias.

**b)** O despiste dos portadores das bactérias acima mencionadas, destina-se a detetar os portadores são que constituem uma fonte perigosa de contágio, uma vez que disseminam um grande número de microrganismos patogénicos. Para além disso, na presença de fatores predisponentes, esses microrganismos podem invadir sítios estéreis adjacentes ou a corrente sanguínea, e causar infeção localizada ou sistémica no próprio hospedeiro. Neste caso são feitos quer o exame direto (citológico e Gram), quer o exame cultural (COS e PVX, incubados em atmosfera de 5 a 7 % de CO<sub>2</sub> a 35-37°C, durante 48 horas).

## Secreções do Trato Respiratório Inferior

O trato respiratório inferior constituído pela traqueia, brônquios, bronquíolos e pulmões, é geralmente estéril, embora possa ocorrer colonização transitória por secreções das vias aéreas superiores. As infeções no trato respiratório inferior podem resultar da inalação de aerossóis infecciosos, aspiração de conteúdo oral ou gástrico ou disseminação hematogénea. As mais comuns são: bronquites e bronquiolites, causadas essencialmente por vírus; pneumonias adquiridas em comunidade, em que o agente etiológico mais comum em

adultos é *Streptococcus pneumoniae*; e pneumonias nosocomiais causadas principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*, enterobactérias, *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae* [4].

Para o diagnóstico laboratorial destas infecções, chegam ao laboratório uma grande variabilidade de amostras, incluindo expetorações, lavados brônquicos, lavados broncoalveolares e aspirados brônquicos. Nas amostras de expetoração, a colheita deve ser feita de manhã através de tosse profunda, uma vez que, devido à acumulação de secreções durante a noite, a amostra vai ser mais representativa, aumentando as hipóteses de isolar o microrganismo responsável. Amostras de saliva ou rinorreia posterior devem ser desprezadas. A avaliação da qualidade da amostra, também é fulcral nas expetorações, uma vez que nestas poderá haver contaminação com conteúdo da orofaringe e microbiota associada, sendo esse um critério de rejeição. Nesse sentido, é feito um esfregaço com coloração de Gram, para a observação da quantidade de leucócitos e células epiteliais pavimentosas. Segundo o critério de *Murray e Washington*, a observação, na objetiva de 10x, de pelo menos 25 leucócitos e no máximo 10 células epiteliais, em cerca de 10 campos, é o critério para considerar a amostra de boa qualidade para o exame bacteriológico [3].

Independentemente do tipo de secreção, é efetuado o esfregaço para coloração de Gram tendo em vista a observação do predomínio de algum tipo morfológico. A observação de diplococos Gram positivos, por vezes capsulados, é sugestivo de *S. pneumoniae* enquanto que cocobacilos Gram negativo pleomórficos, sugere infecção por *H. influenza* [3]. Para além do Gram, é feito o esfregaço para coloração de *Wright* no sentido de observar células epiteliais, leucócitos, nomeadamente polimorfonucleares, e outras células.

O exame cultural é efetuado com inoculação das geloses MCK (incubado em aerobiose, a 37°C) HAE2 e CNA (incubados em atmosfera de 5 a 7 % de CO<sub>2</sub> a 35-37°C, durante 48 horas). Na gelose CNA realiza-se a prova da optoquina, um antibiótico ao qual *Streptococcus pneumoniae* é sempre sensível. Assim, o aparecimento de um halo de inibição, permite um diagnóstico presuntivo deste microrganismo. Para além disto, sendo uma gelose de sangue, será ainda possível observar alfa-hemólise de *S. pneumoniae*, com o aparecimento de uma zona cinzenta ou esverdeada ao redor das colónias. Na gelose HAE2, o crescimento de colónias pequenas, redondas e translúcidas poderá ser sugestivo de *H. influenzae*. A presença do fator V (nicotinamida adenina dinucleótido) e do fator X (hemida) neste meio de cultura, permite o crescimento deste microrganismo fastidioso que carece de ambos os fatores para o seu desenvolvimento. Adicionalmente poderá ser feito, a partir das colónias isoladas, as provas da oxidase e da catalase, que no caso de *H. influenza*, são ambos positivos [3].



Toda a interpretação feita a partir das culturas, deve ser conjugada com as observações recolhidas pelo Patologista Clínico a partir do exame direto, e ainda com a informação clínica do utente. Só assim se saberá quais as colónias a valorizar para a posterior identificação e TSA.

## Pesquisa de Micobactérias

As infeções por micobactérias ou bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR) constituem uma enorme preocupação de saúde pública a nível mundial. A micobactéria *Mycobacterium tuberculosis* é o agente etiológico da tuberculose pulmonar, causando cerca de 2 milhões de mortes todos os anos. Esta micobactéria é geralmente inalada (um bacilo viável é suficiente para causar doença), sendo os pulmões o principal órgão-alvo [5].

O tipo de amostras pode variar, no entanto as mais frequentes são expetorações. O exame direto é feito pela coloração de *Ziehl-Neelsen* onde BAAR adquirem uma coloração avermelhada (diagnóstico presuntivo). O elevado conteúdo lipídico (ácidos micólicos) da parede celular dos BAAR, cria uma barreira hidrofóbica que afeta a permeabilidade, dificultando a ação dos mordentes e diferenciadores de corantes aquosos [1]. Por este motivo, não se utiliza a coloração de Gram no exame direto de BAAR, mas sim a coloração anteriormente referida.

O exame cultural é mais sensível do que o exame direto e é necessário para a identificação da espécie de micobactéria. No entanto, a recuperação de BAAR pode ser difícil uma vez que, sendo microrganismos de crescimento lento, a sua presença pode passar despercebida devido a outros microrganismos de crescimento rápido existentes na amostra [1]. Neste sentido, as amostras devem ser previamente submetidas a processos de homogeneização, descontaminação e concentração, no sentido de eliminar bactérias contaminantes e aumentar a probabilidade de detetar BAAR, caso estes estejam presentes [5]. A amostra é depois semeada em meio *Lowenstein Jensen*, enriquecido com a presença de ovo, de asparagina e de fécula, que favorece o crescimento de BAAR. Este meio é incubado a 37°C numa atmosfera capnófila (5 a 10% CO<sub>2</sub>) [4]. Devido ao crescimento lento, o meio deve ser incubado durante 60 dias para se considerar a cultura negativa, sendo feitas observações semanalmente. As colónias de *M. tuberculosis* apresentarão um aspeto característico semelhante a couve-flor.

---

## 5.4.7 LÍQUIDOS DE CAVIDADES SEROSAS

Os líquidos de cavidades serosas (pleural, peritoneal, ascítico, sinovial), são produtos normalmente estéreis, daí que qualquer microrganismo que se desenvolva deve ser investigado [3].

A colheita destas amostras deve seguir sempre uma técnica asséptica, e deve ser feita para recipiente esterilizado seco com tampa de rosca. O volume recomendado para o estudo bacteriológico é no mínimo de 1 mL de amostra. Adicionalmente podem fazer-se colheitas com inoculação em frasco para Hemocultura, o que não dispensa o envio de produto para exame direto ou outros estudos laboratoriais [3].

No laboratório GS-CML Viseu, o processamento destas amostras, passa em primeiro lugar pelo exame direto (coloração de Gram) e de seguida pelo exame cultural, inoculando os meios sólidos CNA, PVX (incubados em atmosfera de 5 a 7 % de CO<sub>2</sub> a 35-37°C, durante 48 horas) e MCK (incubado em atmosfera de aerobiose, a 35°C, durante 18 a 24 horas) e o meio de enriquecimento BHI. No caso deste último apresentar turvação às 24h, deve ser feita a subcultura para os mesmos meios sólidos utilizados anteriormente. A interpretação final deve ter em conta o estado clínico do doente e o microrganismo isolado [3].

---

## 5.4.8 SANGUE (HEMOCULTURA)

A grande maioria das doenças infecciosas podem decorrer com bacteriemia transitória, intermitente ou persistente. Como o sangue é um produto biológico estéril, o isolamento de um microrganismo a partir duma hemocultura é geralmente o agente etiológico da infeção [3]. As infeções são normalmente designadas por septicémias e são consideradas das patologias mais graves, sendo fulcral o seu correto e rápido diagnóstico.

As colheitas são feitas em garrafas de hemocultura e, uma vez que a quantidade de microrganismos em circulação é normalmente baixa, especialmente se o doente já está com antibioterapia, torna-se importante colher volume suficiente (cerca de 10mL a 30mL em adultos) [3]. É importante desinfetar muito bem a pele do local antes da colheita, para evitar a contaminação da amostra com a microbiota da pele, nomeadamente *Staphylococcus epidermidis* [5]. No entanto em doentes debilitados estes microrganismos comensais podem ter um papel patogénico importante e por isso devem efetuar-se colheitas de várias amostras individuais do sangue, 3 hemoculturas em 24 horas, colhidas separadamente [3]. O isolamento

da mesma espécie de microrganismo, a partir de amostras diferentes, sugere que ele se encontra, provavelmente, presente como causa de infecção e não como contaminante.

As garrafas que chegam ao laboratório são imediatamente colocadas no **BACTEC 9050**. Ao fim do tempo de incubação definido (7 dias) as garrafas que não positivaram são consideradas negativas. Se o equipamento indicar que uma das hemoculturas é positiva, é feita uma subcultura a partir da garrafa para COS e PVX (incubados a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>) e é feito ainda um esfregaço em lâmina para se proceder à coloração de Gram. Caso haja crescimento a valorizar, prossegue-se para a identificação e TSA. Na presença de mais de três microrganismos é dado como contaminação. É fundamental salientar que a valorização clínica dos resultados obtidos depende sempre do contexto clínico. Os agentes mais comuns associados a bacteriemia são *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella spp* [1].

---

## 6. HEMATOLOGIA

A Hematologia é uma área laboratorial importante que visa o estudo dos órgãos hematopoiéticos, da hematopoiese e da hemostasia. Através da análise qualitativa e quantitativa dos elementos figurados do sangue, é possível identificar alterações que contribuem para o diagnóstico de doenças hematológicas. Para além disso, a análise do plasma permite avaliar os distúrbios na coagulação, bem como a monitorização terapêutica de doentes hipocoagulados.

No Laboratório GS-CML Viseu os parâmetros avaliados neste setor incluem os parâmetros do hemograma (eritograma, leucograma e trombocitograma), a velocidade de sedimentação eritrocitária (VSE), a hemoglobina glicada (HbA1c) e parâmetros de coagulação (tempo de Protrombina (TP) e tempo de Tromboplastina parcial ativado (aPTT)).

---

### 6.1 HEMOGRAMA

O hemograma é o pedido que representa o maior volume de trabalho no setor da Hematologia e proporciona a avaliação dos três componentes principais do sangue periférico: eritrócitos, leucócitos e plaquetas, sendo assim, a base de qualquer avaliação hematológica [8].

A amostra utilizada no hemograma é sangue total, utilizando como anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) tripotássico (K3). O EDTA é o anticoagulante de eleição para este tipo de determinação, não só porque forma complexos irreversíveis com o cálcio (ião essencial ao processo de coagulação), como também inibe a agregação plaquetar, por inibição da desgranulação [8]. Além disso, o EDTA não altera a morfologia das células sanguíneas. Considerando que a técnica é baseada no tamanho e morfologia das células, esta característica do anticoagulante torna-se indispensável. Tal como todas as amostras, estas também devem ser processadas o mais rápido possível, depois de devidamente homogeneizadas [9].

No laboratório GS-CML Viseu, o hemograma é um processo automatizado, realizado nos equipamentos **XT-1800i** e **XT-4000i** da **Sysmex**. O primeiro equipamento é utilizado nas amostras de rotina com pedidos apenas de hemograma, e o segundo equipamento utilizado nas amostras do Serviço de Urgência e amostras de rotina que ainda tenham mais requisições. Estes analisadores hematológicos permitem melhorar a eficiência do fluxo de trabalho uma vez que não requerem uma preparação prévia das amostras. Além disso têm um modo manual que pode ser usado caso a amostra necessite de uma pré-diluição, ou caso a quantidade da amostra seja pequena.

---

## 6.1.1 SÉRIE ERITROCITÁRIA – ERITROGRAMA

O eritrograma é a parte do hemograma que permite avaliar e contar as células vermelhas do sangue, os eritrócitos. Estas células anucleadas, em forma de disco bicôncavo, circulam em média 120 dias e são produzidas na medula óssea num processo chamado eritropoiese. Este processo necessita de alguns fatores para ocorrer, como a eritropoietina, produzida essencialmente no rim, e elementos como o ferro, ácido fólico e vitamina B12. Uma proteína importante presente no interior dos eritrócitos é a hemoglobina. Esta consiste numa proteína globular com quatro grupos heme ( $\text{Fe}^{2+}$ ) que são capazes de ligar ao oxigénio, sendo a principal função o transporte do mesmo por todo o organismo [10].

Neste sentido, o eritrograma avalia os seguintes parâmetros:

### ➤ Eritrócitos

Corresponde à contagem de eritrócitos, ou seja, ao seu número por unidade de volume de sangue, expresso em  $\times 10^{12}/\text{L}$ . Esta contagem é realizada pelo equipamento através de um método de deteção por impedância elétrica combinado à tecnologia de foco hidrodinâmico. O método da impedância elétrica baseia-se na determinação de mudanças na condutividade de um meio condutor, como soro fisiológico, durante a passagem das células sanguíneas por uma pequena abertura entre dois eléctrodos. As células são consideradas como partículas não condutoras de electricidade e provocam diminuição da condutividade do meio e aumento da impedância. A pequena abertura por onde as células passam possui diâmetro e comprimento predefinido de acordo com o tipo celular que se deseja contar, e a região ao redor desse orifício chama-se zona de deteção. Mudanças na impedância são proporcionais ao volume das células, fato que possibilita contá-las e separá-las por tamanho. O foco hidrodinâmico combinado à impedância, consiste num método integrado recentemente nos analisadores com o objetivo de controlar o fluxo de amostra que passa pela abertura. Assim, um fluxo constante de diluente passa pelo orifício de contagem, e a suspensão de células é injetada nessa massa líquida em movimento, até formar uma corrente fina de células, as quais passam praticamente uma a uma pela abertura. Após a passagem pela abertura, a amostra diluída é envolvida por outra corrente de fluxo do mesmo diluente e então é removida. Isso impede que os eritrócitos nessa área, recirculem, impedindo a geração de falsos pulsos e, conseqüentemente, de falsas contagens [10].

### ➤ **Hemoglobina (Hb)**

Representa a quantidade de hemoglobina por unidade de volume de sangue, expresso em g/dL. Nos equipamentos utilizados no laboratório GS-CML Viseu, esta determinação baseia-se na adição de lauril sulfato de sódio (LSS), um reagente hemolítico que provoca a lise dos eritrócitos, altera a conformação da hemoglobina, bem como a oxidação do grupo heme. Assim o grupo hidrofílico do LSS liga-se ao grupo heme formando-se o complexo Hb-LSS. Este complexo é um composto colorido que é medido espectrofotometricamente, e assim é quantificada a hemoglobina [10].

### ➤ **Hematócrito (Ht)**

Equivale à fração ocupada pelos eritrócitos no volume total de sangue, expresso em percentagem (%) [10]. A percentagem do Ht é calculada nos equipamentos pela altura dos pulsos cumulativos de todas as contagens de eritrócitos. Essa medida baseia-se no princípio de que a altura do pulso, ou seja, a variação de voltagem, produzida pelas células que passam pelo orifício, é proporcional ao volume da célula.

### ➤ **Índices Hematimétricos**

Correspondem a índices determinados com base na contagem global de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito.

O **Volume Globular Médio (VGM)** é o índice que representa o volume/tamanho médio dos eritrócitos, expresso em femtolitros (fL). Resulta do quociente entre o hematócrito e o número de eritrócitos, multiplicado por 10.

A **Hemoglobina Globular Média (HGM)** é o índice que representa a quantidade de hemoglobina média existente em cada eritrócito, expressa em picogramas (pg). Resulta do quociente entre a hemoglobina e o número de eritrócitos, multiplicado por 10.

A **Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM)** é o índice que representa a concentração média de hemoglobina num determinado volume de eritrócitos, expressa em g/dL. Resulta do quociente entre a hemoglobina e o hematócrito, multiplicado por 100.

A **Amplitude de Distribuição dos Eritrócitos (RDW)** corresponde à amplitude de distribuição do tamanho dos eritrócitos, ou seja, representa o índice de anisocitose eritrocitária e é expresso em % [10].

Para além dos eritrócitos, os reticulócitos (RET) e os eritroblastos (NRBC) também podem ser avaliados no hemograma. Os reticulócitos correspondem a eritrócitos mais jovens libertados da medula óssea para o sangue periférico. Estes diferem dos eritrócitos, porque contêm restos de ácido ribonucleico (RNA) ribossômico que estava presente em grandes quantidades no citoplasma dos precursores nucleados dos quais derivam, os NRBC [8]. O número de reticulócitos no sangue periférico é um reflexo bastante preciso da atividade eritropoiética, permitindo avaliar o grau de resposta da medula óssea. Em condições normais, após amadurecerem por 1 a 3 dias na medula óssea, eles são libertados no sangue periférico, onde circulam por 1 a 2 dias, tempo após o qual se tornam eritrócitos maduros [8].

No laboratório GS-CML Viseu, o único equipamento que faz a contagem de reticulócitos e alerta para a presença de NRBC é o **XT-4000i**. Esta contagem é feita por citometria de fluxo com fluorescência num canal próprio, designado canal **RET/PLT-O**. A contagem passa pela adição de um surfactante que vai perfurar ligeiramente as membranas celulares de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, permitindo assim a penetração do marcador fluorescente na célula. O



**Figura 11** – Diagrama de dispersão de reticulócitos [10].

marcador fluorescente, polimetina, marca então os ácidos nucleicos dos leucócitos, eritrócitos nucleados, reticulócitos e plaquetas. Um laser semiconductor ilumina a amostra e através da dispersão frontal de luz, que avalia o volume celular, e do sinal de fluorescência lateral, que indica a quantidade de ácido nucleico presente, é construído um diagrama de dispersão (Figura 11) onde é possível distinguir os diferentes tipo de populações sanguíneas. Os reticulócitos dividem-se ainda em três categorias, de acordo com a sua intensidade de fluorescência, representando diferentes graus de maturação: reticulócitos de baixa fluorescência (LFR), reticulócitos de média fluorescência (MFR) e ainda reticulócitos de alta fluorescência (HFR). A fração de reticulócitos imaturos (IRF) reflete a proporção de reticulócitos imaturos e é calculada pela soma de MFR + HFR [10].

---

## 6.1.1.1 SÉRIE ERITROCITÁRIA - ALTERAÇÕES QUANTITATIVAS

Muitas patologias distintas provocam alterações nos parâmetros do eritrograma, no entanto é de especial atenção o caso das anemias. Estas são definidas por um valor de Hb inferior ao valor de referência (<13 g/dL nos homens e <12 g/dL nas mulheres), que pode ser acompanhado ou não pela diminuição dos eritrócitos. Para além destes dois parâmetros, as alterações nos valores do VGM e HGM, são de extrema importância porque dão indicações à cerca dos possíveis tipos de anemia. Assim, um VGM < 80 fL e HGM < 27 pg, classificam a anemia como microcítica e hipocrômica, e surge em casos de anemia por deficiência de ferro, talassémias, em alguns casos de anemia da doença crónica, em intoxicações por chumbo e ainda em alguns casos de anemia sideroblástica. Por outro lado, um VGM entre 80 e 100 fL e um HGM entre 27 e 32 pg, ou seja, ambos dentro do intervalo de referência, classificam a anemia como normocítica e normocrômica, e surge em casos de anemia hemolítica, em alguns casos de anemia da doença crónica, em nefropatias, deficiências mistas, e insuficiência da medula óssea (por exemplo após quimioterapia). Por último, um VGM > 100 fl, classifica a anemia como macrocítica e surge em casos de anemias megaloblásticas (deficiência de vitamina B12 e ácido fólico) e em casos de anemias não megaloblásticas (abuso de álcool, hepatopatias, mielodisplasias, anemia aplástica, etc) [9].

Na avaliação das anemias, é fundamental ter o conhecimento da capacidade da medula óssea em responder a esse processo com a produção de novas células, e uma forma simples para essa avaliação é determinar o número de eritrócitos imaturos no sangue periférico. Portanto, a contagem de RET e IRF são indicadores indiretos da atividade eritropoiética da medula óssea e ajudam a distinguir entre anemias regenerativas e arregenerativas. Assim, as anemias hemolíticas adquiridas ou por perda de sangue, caracterizadas pelo aumento na eritropoiese, vão provocar um aumento nos valores de RET e IRF. Já as anemias associadas a doença renal crónica, devido à atividade medular reduzida, vão apresentar valores diminuídos de RET e IRF. No caso de infeções agudas e síndromes mielodisplásicas, os RET podem estar aumentados ou diminuídos, mas o IRF estará aumentado. Para além de serem parâmetros importantes no diagnóstico diferencial das anemias, os valores de RET e IRF também serão importantes na monitorização da eficácia de tratamentos de anemias nutricionais, de transplantes de medula óssea e tratamentos de quimioterapia. Em caso de eficácia, haverá um aumento do IRF que precede o aumento de RET [11].



## 6.1.1.2 SÉRIE ERITROCITÁRIA - ALTERAÇÕES QUALITATIVAS

O eritrograma fornece informações importantes a fim de se diagnosticar algum distúrbio ou patologia que envolva a linhagem eritroide, no entanto, podem existir alterações nos eritrócitos, não detetáveis pelos equipamentos automatizados, que fornecem informações adicionais e cruciais para chegar ao diagnóstico. Assim, com o intuito de avaliar a presença de algum tipo de alterações qualitativas, torna-se importante a observação microscópica do esfregaço de sangue periférico (ESP). Este é realizado a partir da amostra em tudo de EDTA, corado pela coloração de *Wright* e observado ao microscópio na objetiva 100x em óleo de imersão. A avaliação do ESP exige rigor, disciplina e concentração e a observação deve ser realizada no campo ideal onde os eritrócitos não estão distantes uns dos outros, nem sobrepostos.

Na série eritrocitária, as células podem ser avaliadas microscopicamente quanto à variação de cor (anisocromia), de tamanho (anisocitose), e de forma (poiquilocitose). Na avaliação microscópica da anisocromia e anisocitose, podem ser visualizados eritrócitos hipocrócimos, microcíticos e/ou macrocíticos. A observação dessas alterações, deve ser comparada com os valores dos índices hematimétricos obtidos a partir do eritrograma, a fim de confirmar se os mesmos estão corretos. Já na avaliação microscópica da poiquilositose, as principais alterações de morfologia (Figura 12) que podem ser observadas incluem:

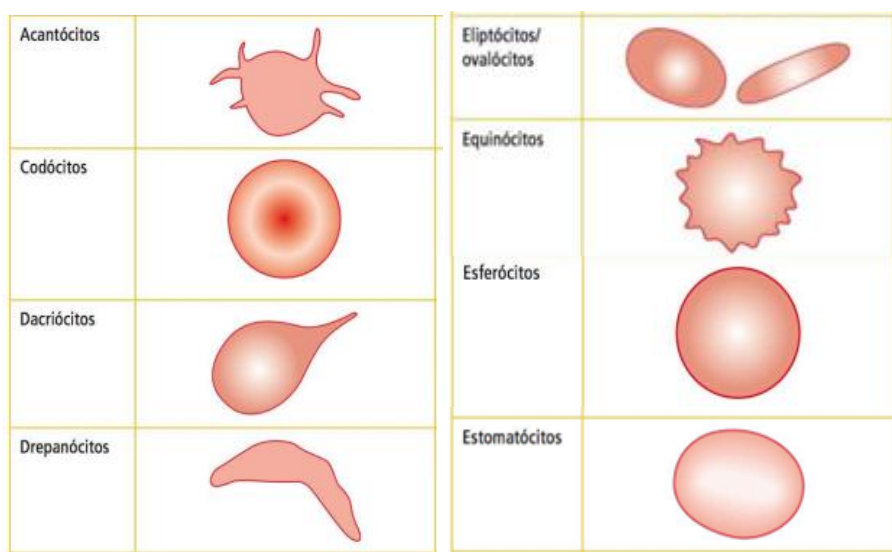


Figura 12 – Alterações morfológicas do eritrócito [10].

➤ **Células em alvo**

Também denominadas *Target Cells* ou codócitos, apresentam-se como células que possuem uma zona descorada ao redor de um ponto central corado. Surgem devido à modificação do conteúdo em lípidos, isto é, devido ao aumento de colesterol e de fosfolípidos, resultando numa elevada relação superfície/volume celular. Em situações que levam à cristalização da hemoglobina na parte central do eritrócito, este também pode surgir com esta morfologia em alvo. Neste sentido, aparecem em hemoglobinopatias, talassemias, doença hepática e anemia por deficiência de ferro [8] [9] [10];

➤ **Estomatócitos**

Correspondem a eritrócitos que apresentam uma fenda central ou estroma em vez de uma área circular de palidez. Aparecem associados a Estomatocitose hereditária, alcoolismo, infecções graves, artefato por exposição dos eritrócitos a pH ácido, substâncias catiónicas e medicamentos (fenotiazina e clorpromazina) [8] [9] [10];

➤ **Equinócitos**

São glóbulos vermelhos com anormalidades na membrana, apresentando projeções curtas distribuídas regularmente na sua superfície. São encontrados em hepatopatias, pós-esplenectomia, mas também pode ser encontrada em caso de uso de heparina ou artefactos em lâminas por substâncias alcalinas [8] [9] [10];

➤ **Acantócitos**

Caracterizam-se por eritrócitos contraídos com múltiplas projeções espiculadas. As protruções superficiais podem variar em tamanho e distribuição e decorrem de alterações na composição lipídica da membrana celular dos eritrócitos. Aparecem em casos de anemia hemolítica, doença hepática, insuficiência renal ou abetalipoproteinémia [8] [9] [10];

➤ **Dacriócitos**

Corresponde a uma alteração no formato da membrana dos eritrócitos, em que as células adquirem uma forma semelhante a uma gota ou lágrima. Esta alteração é consequência de doenças que atingem principalmente a medula óssea, como no caso da mielofibrose. Contudo, também podem aparecer em anemias hemolíticas adquiridas e anemias megaloblásticas [8] [9] [10];

➤ **Eliptócitos/ovalócitos**

São eritrócitos que apresentam forma ovalada ou eliptocítica devido a defeitos genéticos nas proteínas do citoesqueleto da célula. Surgem em situações como Eliptocitose hereditária, anemia megaloblástica, anemia de doença crônica, anemia por deficiência de ferro e mielodisplasias [8] [9] [10];

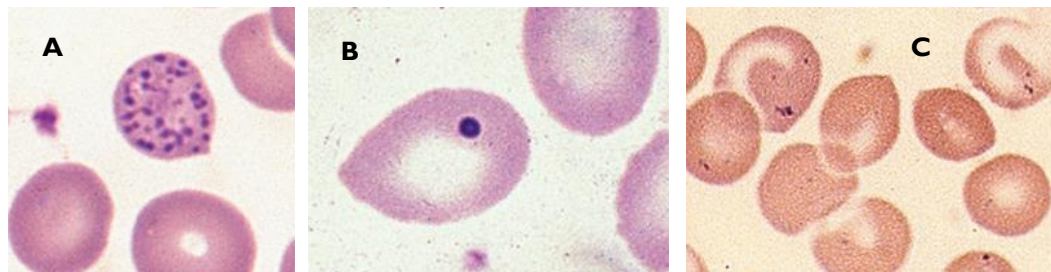
### ➤ **Drepanócitos**

Aparecem na drepanocitose ou anemia falciforme que é uma doença hematológica hereditária, caracterizada pela produção anormal de hemoglobina, entre as quais a mais comum é a forma HbS, que sob determinadas condições de desoxigenação, polimeriza, deformando as hemácias, que assumem uma forma semelhante a uma foice. O eritrócito nesta conformação leva ao fenômeno de vaso-oclusão, que impede o fluxo sanguíneo para os tecidos e órgãos [8] [9] [10];

### ➤ **Esferócitos**

São eritrócitos de forma esférica que perderam a forma bicôncava característica, devido a perda da membrana celular sem perda de citoplasma, o que leva a uma maior "tensão" na membrana celular e, conseqüentemente, a maior fragilidade osmótica desta célula. Os esferócitos são encontrados em algumas anemias hemolíticas, principalmente na Esferocitose Hereditária [8] [9] [10].

Para além da poiquilocitose, a presença de inclusões eritrocitárias (Figura 13), constitui outra das alterações a ter em conta na observação microscópica do ESP. Estas inclusões surgem em determinadas situações e, por isso, reportar a sua presença vai ajudar no correto diagnóstico. As principais inclusões eritrocitárias incluem:



**Figura 13** - Observação microscópica de inclusões eritrocitárias em esfregaços de sangue periférico. (A) Ponteado basófilo. (B) Corpúsculo de *Howell-Jolly*. (C) Corpúsculos de *Pappenheimer* [8].

### ➤ **Ponteado basófilo** (Figura 13 - A)

É formado por agregados ribossomais contendo RNA, na forma de partículas finas ou grossas, que preenchem quase todo o eritrócito. Estão associados a talassemias, hemoglobinopatias, envenenamento por chumbo, deficiência de pirimidina 5' nucleotidase e síndromes mielodisplásicas [10];

### ➤ **Corpúsculos de *Howell-Jolly*** (Figura 13 - B)

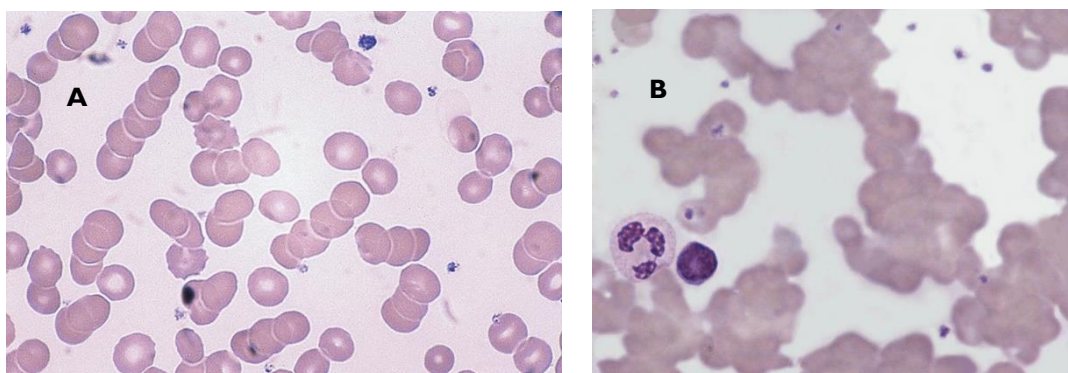
São formados por fragmentos nucleares (restos de ácido desoxirribonucleico (DNA)) e aparecem como pequenos corpúsculos arredondados, de tamanho variável e de cor púrpura

dentro dos eritrócitos. Eles estão associados a hipoesplenismo, pós-esplenectomia, anemia falciforme, talassemia maior, anemia hemolítica grave e anemia megaloblástica [10];

➤ **Corpúsculos de Pappenheimer** (Figura 13 - C)

Correspondem a grânulos anormais de ferro dentro dos eritrócitos e são formados por fagossomas que englobam quantidades excessivas de ferro. Aparecem como densos grânulos localizados na periferia dos eritrócitos e estão associados a anemia sideroblástica e anemias hemolíticas de um modo geral [10].

Na observação do ESP, para além da poiquilocitose e das inclusões mencionadas anteriormente, é possível também avaliar a presença de *rouleaux* eritrocitário e aglutinação eritrocitária. O *rouleaux* eritrocitário (Figura 14 – A) é definido como o empilhamento de eritrócitos na forma de pilhas de moedas na parte fina da extensão. Ocorre como resultado da perda da carga negativa da superfície dos eritrócitos, os quais são revestidos com excesso de proteínas plasmáticas. Está associado com o mieloma múltiplo e estados inflamatórios e infecciosos, já que ambos podem estar associados com hiperproteinémia (globulinas e fibrinogénio). A aglutinação eritrocitária (Figura 14 – B) é formada por agregados de eritrócitos resultantes da presença de um autoanticorpo frio, os quais podem atuar em quaisquer temperaturas abaixo de 37 °C. O anticorpo é uma IgM, e os agregados de eritrócitos geralmente se sobrepõem. Por serem duas situações facilmente confundidas, uma análise atenta deve ser feita para distinguir entre a presença de *rouleaux* e aglutinação [10].



**Figura 14** – Observação microscópica de esfregaços de sangue periférico com *rouleaux* eritrocitário (A) e aglutinação eritrocitária (B) [8].

---

## 6.1.2 SÉRIE LEUCOCITÁRIA – LEUCOGRAMA

O leucograma é a parte do hemograma que permite avaliar e contar as células brancas do sangue, os leucócitos. Os leucócitos constituem uma parte importante na defesa do organismo contra substâncias estranhas ao sistema imunológico. Estas células são produzidas a partir de precursores formados na medula óssea, que amadurecem e se diferenciam em polimorfonucleares (neutrófilos, basófilos e eosinófilos) e em mononucleares (monócitos e linfócitos) [9].

O elemento celular mais abundante é o neutrófilo, constituído por um núcleo segmentado com 3 a 5 lóbulos, ligados por uma banda cromatina e granulações neutrófilas. Os eosinófilos são constituídos por um núcleo segmentado, normalmente com 2 lóbulos e por granulações eosinófilas que se caracterizam pela cor laranja e a sua desgranulação está associada à libertação de histamina nas reações alérgicas. Os basófilos são constituídos por núcleos com 3 lóbulos e por granulações basófilas, mais abundantes que as dos neutrófilos e eosinófilos e de cor negra. Os monócitos são a maiores células da linha branca. O núcleo pode ser oval ou reniforme e têm um citoplasma cinzento-azulado e abundante com ou sem vacúolos e com granulações finas. Nos tecidos diferenciam-se em macrófagos. Os linfócitos são células pequenas, com núcleo oval com cromatina densa e um citoplasma pouco abundante e azul-claro [10].

Os leucócitos são contabilizados nos equipamentos automatizados, num canal *DIFF* (contagem diferencial de leucócitos), que distingue entre neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos, e num canal *WBC/BASO* onde ocorre a diferenciação dos basófilos em relação aos restantes leucócitos.

No canal *DIFF* um surfactante promove a lise dos eritrócitos e permeabiliza a membrana dos leucócitos, que ficam com poros muito reduzidos na membrana, por onde entra um corante fluorescente, a polimetina, que se liga ao ácido nucleico. Os leucócitos são depois analisados por citometria de fluxo por fluorescência, recorrendo aos detetores de dispersão lateral e fluorescência lateral. A intensidade da dispersão lateral fornece informação sobre o conteúdo celular, como por exemplo, núcleos e grânulos enquanto que a fluorescência lateral indica a quantidade de DNA e RNA presente na célula. A informação proveniente dos diferentes detetores de luz é agrupada, formando as características de cada tipo de leucócito, que são expressas num gráfico de dispersão permitindo a sua diferenciação.

No canal *WBC/BASO* um reagente ácido produz a lise celular dos eritrócitos e reduz os leucócitos unicamente aos seus núcleos, com exceção dos basófilos, que não são afetados pelo reagente. As diferenças resultantes entre os basófilos e as outras células são analisadas

utilizando a informação proveniente do detetor de dispersão frontal, que fornece informação sobre a dimensão da célula, e do detetor de dispersão lateral.

Os equipamentos apresentam ainda um sistema de alertas para a presença de células precursoras e alterações morfológicas e/ou quantitativas nas diferentes populações celulares. Assim, é através do canal *DIFF* que é fornecida informação acerca da presença de granulócitos imaturos, emitindo um *flag*. Quando surgem estas mensagens, em conjunto com parâmetros alterados assinalados com asterisco, o procedimento indicado é a confirmação dos resultados através da observação do ESP.

## 6.1.2.1 SÉRIE LEUCOCITÁRIA – ALTERAÇÕES QUANTITATIVAS

O leucograma fornece-nos, quer em percentagem, quer em valor absoluto, a contagem das diferentes populações de leucócitos que circulam na corrente sanguínea. No entanto, esses valores podem sofrer alterações por múltiplos fatores, como idade, gravidez, obesidade, tabagismo, e/ou alguma patologia. Assim, torna-se importante avaliar as alterações quantitativas fornecidas pelo leucograma, a fim de, juntamente com outros parâmetros analíticos, entender a etiologia dessas alterações [12].

A **leucocitose** é definida como a contagem de leucócitos acima do intervalo normal de referência (entre  $4,50 \times 10^3$  e  $11,00 \times 10^3$  células/ $\mu\text{L}$ ) e as condições associadas ao aumento de cada população leucocitária encontram-se na Tabela 2.

**Tabela 2** - Condições que elevam as diferentes populações de leucócitos [12].

| <b>Leucócitos</b>  | <b>Valor absoluto</b>               | <b>Condições associadas</b>   |
|--------------------|-------------------------------------|---|
| <b>Neutrófilos</b> | $> 10,00 \times 10^3 / \mu\text{L}$ | Infeções, indução por fármacos, inflamação crónica, tabagismo, stress, exercício físico, necrose de tecidos, distúrbios mieloproliferativos, hemólise |
| <b>Linfócitos</b>  | $> 5,00 \times 10^3 / \mu\text{L}$  | Infeções virais, infeções bacterianas, distúrbios endócrinos, leucemia aguda ou crónica (leucemia linfocítica crónica como causa mais comum)          |
| <b>Monócitos</b>   | $> 0,80 \times 10^3 / \mu\text{L}$  | Infeções virais e fúngicas, doenças autoimunes como por exemplo lúpus e artrite reumatóide  |
| <b>Eosinófilos</b> | $> 0,50 \times 10^3 / \mu\text{L}$  | Infeções parasitárias, doenças alérgicas, indução por fármacos, condições dermatológicas, neoplasias  |
| <b>Basófilos</b>   | $> 0,10 \times 10^3 / \mu\text{L}$  | Condições alérgicas, leucemias, doenças inflamatórias crónicas  |

Por outro lado, a **leucopenia** define-se como a contagem de leucócitos abaixo do intervalo normal de referência, e as condições associadas ao decréscimo de cada população leucocitária encontram-se na Tabela 3.

**Tabela 3** - Condições que decrescem as diferentes populações de leucócitos [12].

| <b>Leucócitos</b>  | <b>Valor absoluto</b>        | <b>Condições associadas</b>  |
|--------------------|------------------------------|--|
| <b>Neutrófilos</b> | $< 2,00 \times 10^3 / \mu L$ | Medicação, infeções virais, infeções bacterianas graves, sépsis, deficiências nutricionais, doenças hematológicas, doenças autoimunes, distúrbios congénitos |
| <b>Linfócitos</b>  | $< 1,00 \times 10^3 / \mu L$ | Transtorno de stress agudo, infeção por vírus da imunodeficiência humana (HIV), imunossuppressores, insuficiência da medula óssea                            |
| <b>Monócitos</b>   | $< 0,10 \times 10^3 / \mu L$ | Transtorno de stress agudo, terapias com glucocorticóides, anemia aplásica, tricoleucemia, quimioterapia   |
| <b>Eosinófilos</b> | $< 0,05 \times 10^3 / \mu L$ | Transtorno de stress agudo, terapias com glucocorticóides, HIV   |

A contagem de granulócitos imaturos, como já referido anteriormente, é também disponibilizada pelos equipamentos, e engloba a soma de metamielócitos, mielócitos e promielócitos. Os granulócitos imaturos, normalmente ausentes no sangue periférico, podem estar aumentados em situações como infeções bacterianas, doenças inflamatórias agudas e cancro, particularmente aqueles com metástase óssea. Também podem estar aumentados na necrose tecidual, rejeição aguda aos transplantes, traumatismos cirúrgicos e ortopédicos, doenças mieloproliferativas, uso de esteroides e na gravidez, principalmente durante o terceiro trimestre. O aumento dos granulócitos imaturos em percentagem superior a 2%, mesmo se isolado, pode ser útil para identificar uma infeção aguda, mesmo quando não há suspeita clínica. As contagens automatizadas superiores a 2% podem ser consideradas como um indicativo da necessidade de observação microscópica da lâmina [10].



---

## 6.1.2.2 SÉRIE LEUCOCITÁRIA – ALTERAÇÕES QUALITATIVAS

A avaliação do esfregaço sanguíneo e a contagem diferencial de leucócitos em microscopia é realizado em casos específicos e selecionados, isto porque os equipamentos automatizados ainda não são capazes de identificar e distinguir corretamente todas as células e alterações das mesmas. Assim, cabe ao patologista clínico identificá-las microscopicamente a fim de se evitar a emissão de um resultado errôneo. Existem vários critérios para indicação de microscopia, podendo variar entre os diferentes laboratórios.

Na série leucocitária algumas das alterações que podem ser observadas no ESP incluem:

➤ **Neutrófilos hipersegmentados** (Figura 15 - A)

Correspondem a neutrófilos que apresentam 6 ou mais lóbulos e são um dos sinais mais específicos das anemias megaloblásticas. Podem ainda aparecer devido ao uso de corticóides, em mielodisplasias, quimioterapia e, muito raramente, em anemias por deficiência de ferro [10];

➤ **Granulócitos hipossegmentados** (Figura 15 – B)

A hipossegmentação indica a diminuição da segmentação ou a não segmentação do núcleo de granulócitos maduros. Pode ser vista primariamente em neutrófilos, mas pode também ser vista em eosinófilos e basófilos em determinadas situações. No caso de neutrófilos o aparecimento de formas bilobuladas ou unilobuladas está associado à síndrome de *Pelger-Huet*. Trata-se de uma anomalia benigna, de herança autossômica dominante que tem como característica a falta de diferenciação final dos neutrófilos. Nos heterozigóticos o núcleo apresenta-se com dois lóbulos, mais arredondados que o normal, e em forma de óculos, halteres ou amendoins, com acentuada condensação da cromatina. Já nos homozigotos, os neutrófilos apresentam núcleos ovais ou redondos, excêntricos e com cromatina mais condensada, lembrando morfológicamente um mielócito ou metamielócito. Neste sentido, é de extrema importância fazer a distinção entre um desvio nuclear à esquerda devido a esta anomalia, que é desprovido de significado clínico, e um verdadeiro desvio nuclear à esquerda, observado, por exemplo, num quadro infeccioso [10];

➤ **Granulações tóxicas, corpúsculos de Dohle e vacúolos citoplasmáticos**

A granulação tóxica (Figura 15 – C) corresponde ao aumento de granulação azurófila em metamielócitos e neutrófilos (bastonetes e segmentados), células que, em situações fisiológicas, não têm essas granulações reveladas, em decorrência do aumento da proliferação dos neutrófilos com abreviação da mitose, em que a célula não tem tempo de fazer a maturação adequadamente. Os corpúsculos de *Dohle* que podem acompanhar as granulações

tóxicas são a visualização do retículo endoplasmático rugoso, que fica alterado devido à grande proliferação celular. O aparecimento de granulações tóxicas e corpúsculos de *Dohle* pode estar correlacionado com infecções bacterianas graves. A presença de vacúolos citoplasmáticos nos neutrófilos (Figura 15 – D) é observada em estados infecciosos e evidenciam fagocitose de bactérias na corrente sanguínea, ou seja, uma bacteremia ou uma septicemia [10];

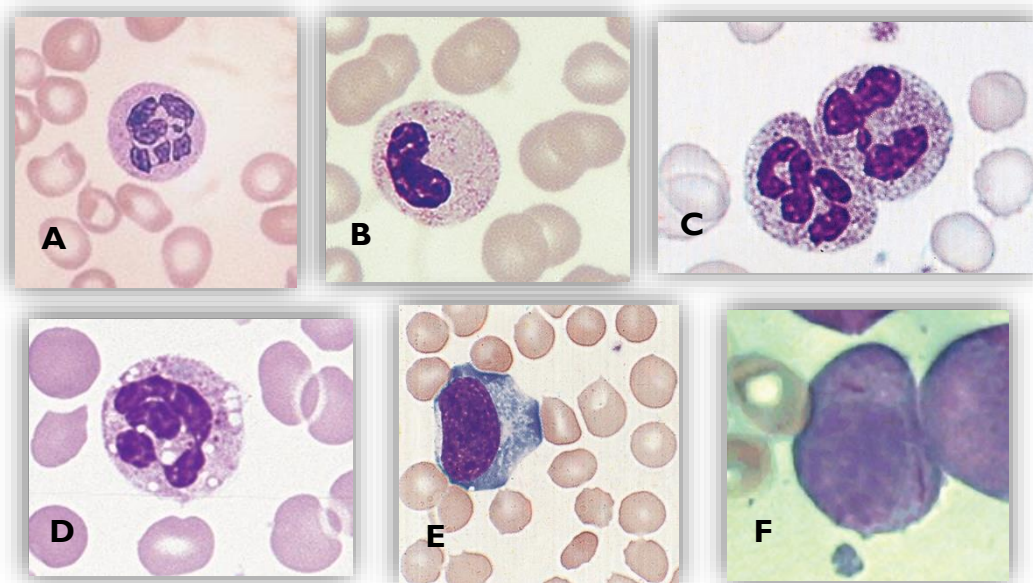
➤ **Linfócitos atípicos/reativos** (Figura 15 – E)

Linfócitos circulantes que apresentam citoplasma abundante com intensa basofilia, e são geralmente maiores do que o normal. Estes linfócitos aparecem após estimulação antigénica destas células, por exemplo, nas vacinações ou doenças que induzem a resposta imune humoral, como mononucleose infecciosa e outras doenças virais. Contudo são células que geram controvérsias em relação à classificação morfológica, uma vez que possuem grande variação de tamanhos, formas e intensidade da basofilia [8] [10];

➤ **Blastos**

São células indiferenciadas que podem ser de origem linfóide, os linfoblastos, e aparecem na leucemia linfocítica aguda; ou de origem mielóide, os mieloblastos, e aparecem na leucemia mielóide aguda (LMA). Um achado hematológico fortemente sugestivo de LMA é a presença, especificamente nos blastos e promielócitos, de bastonetes de *Auer* (Figura 15 – F). Estes são estruturas citoplasmáticas em forma de bastonete de coloração púrpura, derivadas dos grânulos azurófilos e, portanto, caracterizam a origem mielóide desses blastos [10].

Uma contagem baixa de blastos também pode ser encontrada em neoplasias mielóides crónicas, como síndromes mielodisplásicas e neoplasias mieloproliferativas.



**Figura 15** – Observação microscópica de alterações na série leucocitária em esfregaços de sangue periférico [8]. (A) Neutrófilo hipersegmentado. (B) Neutrófilo hiposegmentado. (C) Neutrófilo com granulação tóxica. (D) Neutrófilo com vacúolos citoplasmáticos. (E) Linfócito atípico. (F) Promielócito com bastonetes de *Auer*.

---

### 6.1.3 SÉRIE PLAQUETÁRIA – TROMBOCITOGRAMA

O trombocitograma corresponde à parte do hemograma que permite avaliar e contabilizar as plaquetas presentes no sangue periférico.

Na medula óssea, por ação da trombopoietina, a linhagem mieloide leva à trombocitopoiese, originando as plaquetas. São fragmentos do megacariócito de tamanho muito reduzido, forma irregular, anucleados e incapazes de realizar divisão celular. Circulam entre 8 e 10 dias, sendo posteriormente retiradas da circulação pelo baço. A renovação plaquetária está em torno de 35 000 plaquetas/ $\mu$ L/dia. Têm um papel fundamental visto que são responsáveis pela hemóstase primária (funções de adesão e agregação), participam da hemóstase secundária (correlacionam-se com os fatores da coagulação) e estão envolvidas nos mecanismos de trombose. [10].

Os equipamentos do laboratório GS-CML Viseu, realizam a contagem das plaquetas pelo método de impedância elétrica já explicado anteriormente. O equipamento **Sysmex XT-4000i** faz ainda uma contagem mais precisa por fluorescência ótica no canal *RET/PLT-O*. Os parâmetros plaquetares avaliados compreendem o número de plaquetas em valor absoluto, e o volume plaquetar médio (VPM) em femtolitros.

---

### 6.1.3.1 SÉRIE PLAQUETÁRIA – ALTERAÇÕES QUANTITATIVAS

No sentido de manter a hemostasia sanguínea, o valor de plaquetas no sangue periférico de um indivíduo adulto saudável varia entre 150 a 400 x 10<sup>3</sup> plaquetas/ $\mu$ L. Existindo alterações no número e/ou função das plaquetas, o processo de hemostasia sanguíneo encontra-se comprometido, podendo ocorrer eventos hemorrágicos e/ou trombóticos graves. É necessário que exista um equilíbrio constante entre a trombocitopoiese e o consumo plaquetário, pois um desequilíbrio nestes processos pode conduzir a valores superiores ou inferiores aos valores de referência mencionados, ocorrendo assim casos de trombocitose ou trombocitopenia, respetivamente.

#### Trombocitose

A trombocitose, aceite pela generalidade dos autores como um valor de plaquetas superior a 400 x 10<sup>3</sup>/ $\mu$ L num adulto, pode ser classificada como **secundária/reactiva**, **primária/clonal** ou hereditária/familiar, de acordo com a sua etiologia.

A **trombocitose secundária/reactiva** corresponde à causa mais frequente de trombocitose na população em geral, sendo observada numa grande variedade de condições subjacentes como por exemplo, lesão tecidual devido a cirurgia, infeção, inflamação crónica ou neoplasia. A trombocitose reativa surge essencialmente devido à presença de elevados níveis endógenos de interleucina-6, bem como de outras citocinas e/ou catecolaminas, presentes na resposta de fase aguda de doenças inflamatórias, infecciosas e neoplásicas. A interleucina-6 é o principal mediador celular responsável pela sobreprodução hepática de trombopoietina e dessa forma estimula o processo de trombocitopoiese a nível da medula óssea [13].

A **trombocitose primária/clonal** corresponde a um grupo de doenças caracterizado pela expansão clonal descontrolada de uma linhagem celular específica de células progenitoras, descendentes de uma célula estaminal hematopoiética pluripotente, conduzindo a um excesso de células sanguíneas maduras. A trombocitose primária/clonal é encontrada principalmente nas doenças mieloproliferativas crónicas, particularmente na trombocitemia essencial, policitemia vera, mielofibrose primária e leucemia mielóide crónica (LMC). A mieloproliferação anormal deve-se à ativação constitucional de vias de transdução de sinal, causada por rearranjos genéticos ou mutações que afetam as proteínas tirosina cinase ou moléculas relacionadas. A presença de mutações somáticas no gene JAK2 (codifica para uma

tirosina cinase) e no gene MPL (codifica para o recetor da trombopoietina) conduz a uma orientação mais eficiente do sinal da trombopoietina e por consequência a uma produção plaquetária aumentada [13].

## **Trombocitopenia**

A trombocitopenia é definida por um valor de plaquetas inferior a  $150 \times 10^3/\mu\text{L}$ . As trombocitopenias devem ser avaliadas e monitorizadas, devido à sua associação com manifestações hemorrágicas, cuja gravidade é determinada pelo valor da trombocitopenia. Contudo, uma baixa contagem de plaquetas não indica a presença de uma etiologia específica, podendo estar associada a uma grande variedade de situações clínicas subjacentes, tornando-se essencial a realização de uma investigação adicional. A identificação correta da causa de trombocitopenia é fundamental para o tratamento dos doentes [14].

Existem três causas principais para a trombocitopenia:

### **a) diminuição da produção e/ou aumento da destruição das plaquetas**

A trombocitopenia pode surgir devido a defeitos na produção de plaquetas a nível da medula óssea (trombocitopoiese ineficaz, diminuição na produção de precursores megacariocíticos, regulação anormal da trombocitopoiese), como acontece em casos de anemia megaloblástica, leucemias e anemia aplástica. Por outro lado, pode surgir devido a uma *clearance* periférica aumentada de plaquetas, que pode ter uma origem imunológica, como nos casos de púrpura trombocitopénica imune, púrpura pós-transfusional e trombocitopenia induzida pela heparina. Dependendo do agente químico/biológico em causa, a trombocitopenia pode ainda resultar de ambas as situações, quer da diminuída produção de plaquetas, como da destruição plaquetária aumentada. É o que acontece nas trombocitopenias induzidas por xenobióticos e nas causadas por infeções virais [14].

### **b) alteração na distribuição das plaquetas**

A trombocitopenia é uma complicação comum em indivíduos portadores de doença hepática crónica com hipertensão portal e cirrose extensiva, em consequência da esplenomegalia normalmente associada a esta patologia. Em resultado do aumento do volume do baço, ocorre uma maior sequestração dos elementos plaquetários presentes na circulação sanguínea e, por consequência, o número de plaquetas em circulação diminui. Para além disso, o mecanismo de trombocitopenia associado à doença hepática, também se deve a uma diminuição da produção plaquetária a nível da medula óssea, em consequência da menor produção de trombopoietina pelo fígado lesado [14].

### 6.1.3.2 SÉRIE PLAQUETÁRIA – ALTERAÇÕES QUALITATIVAS

A utilização de equipamentos automatizados facilita o trabalho laboratorial, contudo a observação do ESP permanece como um procedimento laboratorial de extrema importância nomeadamente no diagnóstico de trombocitopenias. Quando a trombocitopenia é encontrada de forma acidental durante as análises de rotina, sem existirem sintomas e/ou sinais clínicos sugestivos, nem histórico de um baixo valor de plaquetas, deve realizar-se a observação do ESP, para exclusão de uma possível trombocitopenia artificial, a “pseudotrombocitopenia”. Na maioria dos casos resulta da **agregação plaquetária** ou **satelitismo plaquetário** [14].

O fenómeno de **agregação plaquetária** (Figura 16 - A) envolve principalmente autoanticorpos circulantes dirigidos contra epítopo(s) normalmente escondido(s) no complexo glicoproteico da membrana plaquetária GPIIb/IIIa, que é exposto na presença do anticoagulante EDTA. O epítopo críptico torna-se assim acessível aos anticorpos, que se ligam, ativam as plaquetas e conduzem à agregação. A maioria dos autoanticorpos atuam como aglutininas frias, num intervalo de temperatura ideal entre os 4 a 25°C, correspondendo geralmente a imunoglobulinas do tipo IgG e IgM, e menos frequentemente a IgA. Os analisadores hematológicos contam os aglomerados de plaquetas resultantes como uma única plaqueta gigante ou como pequenos linfócitos, indicando a presença de uma falsa trombocitopenia [15].

O **satelitismo plaquetário** (Figura 16 - B) é um fenómeno *in vitro* raro que ocorre em temperatura ambiente em sangue periférico também tratado com EDTA. Neste caso, um autoanticorpo IgG é direcionado contra o complexo GPIIb/IIIa e contra um recetor Fc de polimorfonucleares, formando uma “ponte” entre os dois componentes sanguíneos. Conforme o anticorpo reveste as plaquetas, estas, aderindo aos polimorfonucleares, apresentam uma aparência semelhante a uma roseta [16].

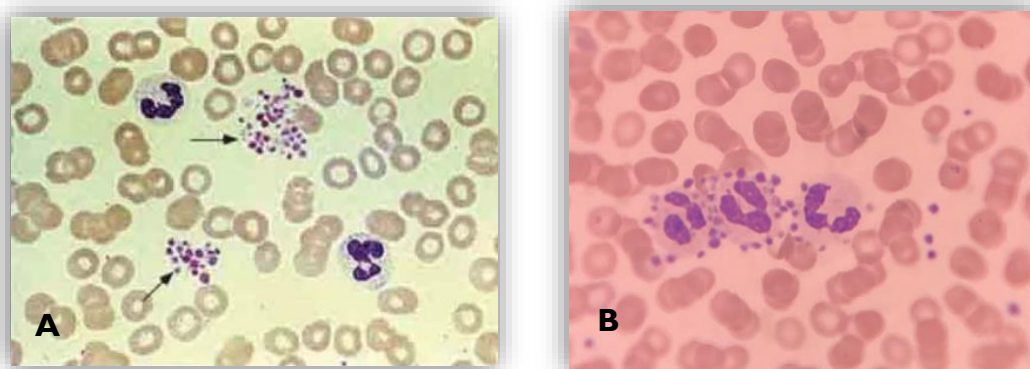


Figura 16 - Observação microscópica de agregação plaquetária (A) [10] e satelitismo plaquetário (B) [16] em esfregaços de sangue periférico.

Em ambos os fenômenos, não existe associação causal definida com nenhuma doença, podendo surgir em indivíduos saudáveis e independentemente da idade ou sexo [15] [16]. No sentido de excluir a presença de uma pseudotrombocitopenia induzida pelo EDTA, e corrigir o valor de plaquetas, deve proceder-se a uma nova colheita de sangue, usando um anticoagulante diferente, habitualmente o citrato. Outros procedimentos incluem uma nova contagem plaquetária, após aquecimento da amostra de sangue a uma temperatura de 37°C durante cerca de 30 minutos, para dissociar os possíveis agregados plaquetários [15]. A avaliação laboratorial criteriosa de situações de pseudotrombocitopenia é de extrema importância para evitar um diagnóstico errado e procedimentos terapêuticos desnecessários.

A presença de plaquetas gigantes e macroplaquetas são outras das alterações da série plaquetária que podem ser observadas no ESP. As plaquetas gigantes estão associadas a situações de macrotrombocitopenias hereditárias e doenças mieloproliferativas, podendo ser contabilizadas erroneamente pelos equipamentos automatizados como eritrócitos, conduzindo assim a uma contagem de plaquetas falsamente diminuída [8] [10]. As macroplaquetas são plaquetas de tamanho aumentado que não chegam a ser do tamanho de plaquetas gigantes. A presença de macroplaquetas está correlacionada com patologias como enfarte agudo do miocárdio, septicemia, gravidez, diabetes *mellitus*, hipertireoidismo, tuberculose, LMC, entre outras [10].

---

## 6.2 VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO ERITROCITÁRIA

A velocidade de sedimentação eritrocitária (VSE) é a distância medida em milímetros que os eritrócitos percorrem num tubo vertical durante um determinado período. A membrana citoplasmática eritrocitária tem carga negativa devido à presença de ácido siálico, que cria um potencial de repulsão entre os eritrócitos, chamado de potencial Zeta. Esse potencial de repulsão impede que os eritrócitos se empilhem e sedimentem rapidamente; por isso os valores de referência da VSE, para pessoas normais, são baixos na primeira hora de sedimentação. Quando ocorrem alterações nas concentrações plasmáticas de moléculas, como fibrinogênio, imunoglobulinas e proteínas de fase aguda, o potencial Zeta é vencido, o empilhamento é formado, e a velocidade de sedimentação aumenta [10].

Entre as condições clínicas mais frequentemente associadas com aumento da VSE, destacam-se a hemodiluição (anemias agudas ou crônicas, sem alteração de morfologia), aumento de proteínas de fase aguda (doença reumática), a presença de proteínas plasmáticas anormais (mieloma múltiplo), o aumento da concentração de imunoglobulinas (processos infecciosos ou inflamatórios) e neoplasias malignas. Assim, embora seja um parâmetro inespecífico, a VSE constitui o principal sinal biológico de inflamação, sendo utilizado como um exame de *screening* e na documentação de processos inflamatórios [10].

No laboratório GS-CML Viseu, a determinação deste parâmetro é realizada no aparelho automatizado **Ves-Matic Cube 30**, que através de um sensor digital (grupo ótico eletrónico) determina automaticamente o nível de sedimentação dos eritrócitos e elabora os resultados que são depois impressos automaticamente ou visualizados no visor. Os resultados são comparáveis com os obtidos pelo método de *Westergren*, mas com uma duração de 33 minutos. A determinação é efetuada sem consumo de amostra, utilização de reagentes ou produção de resíduos. As amostras são submetidas a uma avaliação padronizada da precisão e exatidão dos resultados pelo controlo de qualidade interno, que é realizado diariamente.

Em situações de amostra insuficiente ou erro por parte do equipamento, é realizado o método manual de *Westergren*. Assim, no tubo de sangue total com EDTA, introduz-se um tubo de *Westergren* que irá criar vácuo, fazendo com que o sangue fique posicionado verticalmente ao longo do tubo específico. Após uma hora, efetua-se a leitura em milímetros entre o menisco do plasma e o nível da coluna dos eritrócitos sedimentados.



---

## 6.3 HEMÓSTASE E COAGULAÇÃO

A hemóstase é conseguida por um conjunto de mecanismos que têm diversas funções como por exemplo, manter o sangue num estado fluído enquanto circula no sistema vascular ou parar uma hemorragia através da formação de um coágulo com a posterior dissolução desse coágulo. Assim, os componentes da hemóstase incluem plaquetas, células endoteliais (parede do vaso) e proteínas plasmáticas (fatores de coagulação, inibidores da coagulação e sistema fibrinolítico) [8].

A cascata da coagulação resume o processo de formação do coágulo. É constituída pela via intrínseca e pela via extrínseca, com ativação consecutiva de fatores da coagulação, que convergem numa via final comum, onde há produção de trombina que age sobre o fibrinogénio, transformando-o em fibrina que forma o coágulo [8]. Esta separação das vias só se verifica *in vitro*, porque, *in vivo*, ambas não são independentes uma da outra. Os vários fatores de coagulação envolvidos são na maioria proenzimas sintetizadas pelo fígado, sendo que alguns deles necessitam de vitamina K para a sua síntese (protrombina, fatores VII, IX e X). Os iões cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) têm também um papel fundamental no processo de coagulação, sendo essenciais ao seu correto funcionamento [9]. Para além da formação do coágulo, a dissolução do mesmo é também um mecanismo fundamental, de modo a não comprometer o normal fluxo sanguíneo e serem evitados eventos trombóticos.

O objetivo da avaliação laboratorial da hemóstase sanguínea é identificar as possíveis causas de patologia, e definir a intensidade do defeito na hemóstase responsável pelas doenças hemorrágicas ou trombóticas, para além de ser útil na monitorização da terapêutica antitrombótica. Neste sentido, para os estudos da coagulação é necessária uma amostra de sangue total para um tubo com anticoagulante Citrato de Sódio na proporção 1:9 (anticoagulante: sangue), para obtenção de plasma [10]. Após a colheita a amostra é centrifugada a 3000 rpm durante 15 minutos e processada o mais rápido possível para garantir a qualidade de resultados.

No laboratório GS-CML Viseu, os parâmetros da coagulação que fazem parte das análises de rotina são o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativado (aPTT). Estes parâmetros são determinados no equipamento automatizado **Sysmex CA-500**, através de um método foto-ótico de deteção de coágulos. O método consiste em iluminar a amostra de plasma/mistura de reagente com uma luz vermelha (660 nm) e medir as mudanças na intensidade da luz dispersa, devido ao aumento da turbidez, conforme o fibrinogénio se transforma em fibrina. Um foto díodo absorve a luz dispersa pela amostra e

converte a intensidade detetada em sinais elétricos. Um microprocessador monitoriza esses sinais e usa-os para calcular o tempo de coagulação da amostra. A precisão e qualidade destes resultados são garantidas pelo controlo de qualidade interno, que é realizado diariamente neste equipamento.

O TP mede o tempo de coagulação na presença de uma concentração ótima de tromboplastina (equivalente ao fator tecidual *in vivo*), que ativa a cascata da coagulação. O TP é o exame utilizado para monitorização da terapêutica com anticoagulantes antagonistas da vitamina K, como a varfarina, e avalia a eficiência global da via extrínseca [10]. Reflete, desse modo, alterações em três dos fatores de coagulação dependentes da vitamina K (protrombina, fatores VII e X), fator V e fibrinogénio [9].

A fim de uniformizar os resultados, devido ao uso de diferentes tromboplastinas, utiliza-se mundialmente a Razão Normalizada Internacional (INR). Para o cálculo do INR, é usado o Índice de Sensibilidade Internacional (ISI) como referência, determinado pela comparação de cada reagente com a tromboplastina padrão (OMS):

$$INR = \left( \frac{TP \text{ doente}}{TP \text{ controlo}} \right)^{ISI}$$

O valor normal de INR situa-se entre 0,9 a 1,1, para um indivíduo que não faça terapia com anticoagulantes orais, e entre 2,0 e 3,0 para indivíduo que realize terapia. O TP pode estar elevado, por exemplo, devido ao uso de anticoagulantes orais, deficiência em vitamina K, insuficiência hepática (como cirrose ou hepatite), ou deficiências congénitas ou adquiridas nos fatores envolvidos [10].

O aPTT avalia globalmente a via intrínseca e para isso é realizado sem adição de tromboplastina. O equipamento faz a pré-incubação do plasma com um reagente ativador para iniciar a cascata da coagulação e posteriormente adiciona cloreto de cálcio para a cascata poder progredir e ser medido o tempo de formação do coágulo. Assim, permite o estudo global da atividade dos fatores de coagulação da via intrínseca (pré-callicreína, cininogénio de alto peso molecular, fatores XII, XI, IX e VIII), bem como dos fatores da via comum (fatores X, V, protrombina e fibrinogénio), sendo os resultados expressos em segundos [9]. O aPTT vai estar aumentado na presença de heparina, défices congénitos de determinado fator da via intrínseca ou comum, na coagulação intravascular disseminada ou em casos de hepatopatia [8].

## 7. CASO CLÍNICO

Utente do sexo feminino, 73 anos, dá entrada no serviço de urgência do Hospital CUF Viseu com dor abdominal. As análises prescritas e respetivos resultados encontram-se na Figura 17.

| Patologia Química  |              |               | Hematologia   |                                    |   |
|--|--------------|---------------|---|------------------------------------|---|
| <b>Proteína C Reactiva</b><br><small>(Imunoquímica refoçada com latex)</small>                                 | 23.946 mg/dL | 0.050 - 1.000 | <b>Hemograma</b><br><small>(Cobimetria de fluxo / Citocimica)</small>               |                                    |   |
| <b>Urémia</b><br><small>(Cinética Uréica/ Glutamato Desidrogenase)</small>                                     | 28 mg/dL     | < 50          | <b>Eritrograma</b>  |                                    |   |
| <b>Creatinénia</b><br><small>(Jaffe Cinético modificado)</small>   | 1.23 mg/dL   | 0.55 - 1.02   | Hemoglobina   | 10.6 g/dl                          | 12.0 - 15.0                             |
| <b>Desidrogenase Láctica (LDH)</b><br><small>(Ensaio Enzimático)</small>                                       | 167 U/l      | 81 - 234      | Eritrócitos   | 3.59 x 10 <sup>12</sup> /µl        | 3.80 - 4.80                             |
| <b>Creatinaquinase Total (CK Total)</b><br><small>(Fosfato de creatina)</small>                                | 16 U/l       | 26 - 192      | Hematócrito   | 32.0 %                             | 36.0 - 46.0                             |
| <b>Aspartato aminotransferase (AST)</b><br><small>(Ensaio Enzimático Colorimétrico Ultravioleta 37°)</small>   | 121 U/l      | 15 - 37       | V.G.M.  | 89.1 fl                            | 80.0 - 97.0                             |
| <b>Alanina aminotransferase (ALT)</b><br><small>(Ensaio Enzimático Colorimétrico Ultravioleta 37°)</small>     | 31 U/l       | 14 - 59       | H.G.M.  | 29.5 pg                            | 27.0 - 32.0                             |
| <b>Gama-Glutamil-Transpeptidase (GGT)</b><br><small>(Ensaio Enzimático Colorimétrico Ultravioleta 37°)</small> | 2288 U/l     | 5 - 55        | C.M.H.G.  | 33.1 g/dl                          | 32.0 - 36.0                             |
| <b>Fosfatase Alcalina</b><br><small>(p-Nitrofenolase)</small>  | 854 U/l      | 46 - 116      | R.D.W.  | 15.8 %                             | 11.6 - 14.0                             |
| <b>Bilirrubinas</b><br><small>(Jendrassik-Grof)</small>  |              |               | <b>Leucograma</b>   |                                    |   |
| Bilirrubinémia Total   | 5.61 mg/dL   | 0.20 - 1.00   | Leucócitos  | 16.1 x 10 <sup>3</sup> /µl         | 4.0 - 10.0                              |
| Bilirrubinémia Directa   | 4.88 mg/dL   | 0.00 - 0.20   | Neutrófilos   | 86.4 % 13.91 x 10 <sup>3</sup> /µl | 40.00 - 80.00                           |
| Bilirrubinémia Indirecta   | 0.74 mg/dL   | 0.20 - 0.80   | Eosinófilos   | 0.0 % 0.00 x 10 <sup>3</sup> /µl   | 1.00 - 6.00                             |
| <b>Ionograma sérico</b><br><small>(Potenciometria Iónica)</small>  |              |               | Basófilos   | 0.1 % 0.02 x 10 <sup>3</sup> /µl   | 0.00 - 2.00                             |
| Natrémia   | 135.0 mmol/l | 136.0 - 145.0 | Linfócitos  | 7.6 % 1.22 x 10 <sup>3</sup> /µl   | 20.00 - 40.00                           |
| Kaliémia   | 4.6 mmol/l   | 3.5 - 5.1     | Monócitos   | 5.9 % 0.95 x 10 <sup>3</sup> /µl   | 2.00 - 10.00                            |
| Clorémia   | 99.0 mmol/l  | 98.0 - 107.0  | <b>Trombocitograma</b>  |                                    |   |
|  |              |               | Plaquetas   | 468 x 10 <sup>3</sup> /µl          | 150 - 400                               |
|  |              |               | <b>Tempo de Protrombina (TP)</b><br><small>(Cobagulometria)</small>                 |                                    |   |
|  |              |               | Tempo de Protrombina  | 17.70 segundos                     | 10.30 - 12.80                           |
|  |              |               | INR   | 1.64                               | Intervalo Terapêutico:<br>INR 2.0 - 3.5 |
|  |              |               | <b>T de Tromboplastina Parcial activ. (aPTT)</b><br><small>(Cobagulometria)</small> |                                    |   |
|  |              |               | T de Tromboplastina Parcial activ. (aPTT)   | 29.30 segundos                     | 23.00 - 31.90                           |

Nota: O resultado do Tempo de Protrombina INR (International Normalized Ratio)

[Ref. Bibliográfica: Clinical and Prothrombin Time (PT) Test and

Figura 17 – Boletim Clínico (fonte: Laboratório GS-CML Viseu).

Através do boletim clínico, verifica-se um aumento da bilirrubina direta juntamente com  $\gamma$ -GT e fosfatase alcalina, o que confere origem hepatobiliar, sendo, portanto, sugestivo de colestase extra-hepática, ou também denominada icterícia obstrutiva. Nestas situações, a elevação sérica das transaminases não costuma ser tão acentuada, sendo normalmente abaixo de oito vezes o valor de referência, o que vai de encontro aos resultados obtidos. Uma das manifestações de fluxo biliar reduzido, está relacionada com a má absorção intestinal, incluindo deficiências de vitaminas lipossolúveis como A, D ou K. Esta última pode ser demonstrada pela queda na atividade de protrombina, proporcional à intensidade da colestase. Isto deve-se ao facto de que sem vitamina K, a ativação dos fatores da coagulação dependentes da mesma, acaba por ficar impedida. Assim, ocorre aumento do TP, o que também se verifica nos resultados analíticos desta utente.

Aliado a estas alterações, a proteína C reativa também se encontra extremamente elevada. É uma proteína de fase aguda positiva, marcador de inflamação sistémica, que aumenta em resposta a diversos tipos de lesão, em particular infeções bacterianas, situações clínicas

que constituem estímulos inflamatórios. Para além disto, verifica-se um aumento do número de neutrófilos, que é bastante sugestivo de quadro inflamatório decorrente de infeção bacteriana. Verifica-se também um estado anémico e uma ligeira trombocitose, que poderá também ser resultante do quadro inflamatório derivado à possível infeção.

Após o seguimento da utente, foi diagnosticado uma Colangite com Coledocolitíase, que consiste numa infeção do trato biliar, derivada à obstrução do ducto colédoco (ducto biliar comum) por cálculos biliares.

A obstrução biliar é um fator importante na patogénese da colangite. Em situações normais, a presença de bactérias na bÍlis não é significativa, além disso existem diversos mecanismos defensivos que previnem o aparecimento de uma colangite. Esses mecanismos incluem a atividade bacteriostática dos sais biliares, o próprio fluxo da bÍlis que elimina qualquer bactéria no duodeno, a secreção de IgA pelo epitélio biliar, as células de *Kupffer* e as junções entre os colangiócitos que impedem a translocação de bactérias para o sistema venoso portal. O esfíncter de *Oddi* também impede qualquer migração de bactérias do duodeno para o sistema biliar. No entanto, em caso de obstrução do ducto biliar, ocorre ascensão bacteriana ao colédoco a partir do duodeno, além disso, a bÍlis fica estagnada no sistema biliar, a pressão intra-ductal aumenta, as junções entre os colangiócitos alarga-se, ocorre mau funcionamento das células de *Kupffer* e a produção de IgA é diminuída. Assim, a obstrução do ducto biliar leva a um quadro inflamatório decorrente de infeção bacteriana. Os agentes patogénicos mais frequentemente associados incluem *Escherechia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterococcus* spp. e *Enterobacter* spp. [17].

Em situações crónicas, quando a pressão intra-ductal excede os 25 cm de água, pode ocorrer refluxo colangiovenoso e colangiolímfático, levando à bacteriemia e endotoxemia. Além disso, a libertação sistémica de diversos mediadores inflamatórios leva a um profundo compromisso hemodinâmico [17].

---

## 8. CONCLUSÃO

O estágio curricular realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, permitiu, sem dúvida, aplicar em contexto de trabalho, os conhecimentos teóricos anteriormente adquiridos. Para além disso, foi fundamental para aquisição de novos conhecimentos, percepção da rotina laboratorial, noção da importância do controlo da qualidade, entendimento do funcionamento dos equipamentos, e da validação de resultados.

No laboratório, para tudo funcionar com normalidade, e com vista a dar uma resposta adequada e atempada, é importante que os profissionais tenham espírito de equipa e de entreajuda, e executem as tarefas com responsabilidade e rigor. Para além disso, a comunicação entre o laboratório e os clínicos, é de extrema importância para uma validação adequada dos resultados. Contudo, essa comunicação ainda falha com muita frequência, o que dificulta o trabalho desenvolvido nas fases analítica e pós-analítica. Neste sentido, uma melhor comunicação entre ambas as partes, será algo a almejar num futuro próximo, para que assim os laboratórios possam fornecer respostas mais rápidas com resultados mais rigorosos e fidedignos.

Em suma, este estágio curricular foi extremamente enriquecedor, não só a nível profissional, como também a nível pessoal, e saio do mesmo com mais experiência laboratorial, mais destreza e mais confiança para enfrentar os desafios futuros.

---

## 9. BIBLIOGRAFIA

---

- [1] Murray, P.R.; Rosenthal, K.S.; Pfaller, M.A., **Medical Microbiology**, 8ª ed., Elsevier Health Sciences, 2016.
- [2] Forbes, B.A.; Sahm, D.F.; Weissfeld, A.S., **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology**, 12ª ed., Mosby Elsevier Health Sciences, 2007.
- [3] Fonseca, A.B. *et al*, **Orientações para elaboração de um manual de boas práticas**, Ministério da Saúde Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2004.
- [4] Mahon, C.R.; Lehman, D.C.; Manuselis, G., **Textbook of Diagnostic Microbiology**, 5ª ed., Elsevier, 2015.
- [5] Engelkirk, P.G.; Duben-Engelkirk, J., **Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Essentials of Diagnostic Microbiology**, Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
- [6] Gopi, A.; Ravikumar, K.L.; Ambarish, M.G.; Shwethlatha, N.N., **“Time to Positivity of Microorganisms with BACTEC 9050: an 18-month Study Among Children of 28 Days to 60 Months in a South Indian Tertiary Hospital,”** *Internation Journal of Microbiological Research*, vol. 2, nº 1, pp. 12-17, 2011.
- [7] Viana, H.L., **“Clostridium difficile: infecção e ribotipos,”** *Jornal Português de Gastreenterologia*, vol. 20, nº 6, pp. 240-242, 2013.
- [8] Bain, B.J.; Bates, I.; Laffan, M.A., **Dacie and Lewis Practical Haematology**, 12ª ed., Elsevier, 2017.
- [9] Hoffbrand, A.; Moss, P., **Fundamentos em Hematologia**, 6ª ed., Artmed, 2013.
- [10] Silva, P.H. *et al*, **Hematologia Laboratorial Teoria e Procedimentos**, Artmed, 2016.
- [11] Buttarello, M., **“Laboratory diagnosis of anemia: are the old and new red cell parameters useful in classification and treatment, how?,”** *International Journal of Laboratory Hematology*, vol. 38, pp. 123-132, 2016.
- [12] Parente, J., **“Diagnostics for White Blood Cell Abnormalities,”** *Physician Assistant Clinics*, vol. 4, nº 3, pp. 625-635, 2019.
- [13] Appleby, N.; Angelov, D., **“Clinical and Laboratory Assessment of a Patient with Thrombocytosis,”** *British Journal of Hospital Medicine*, vol. 78, nº 10, pp. 558-564, 2017.

- [14] Erkurt, M.; Kaya, E.; Berber, I.; Koroglu, M.; Kuku, I., **“Thrombocytopenia in Adults,”** *Journal Of Hematology*, vol. 1, n° 2-3, pp. 44-53, 2012.
- [15] Asma, A.; Anissa, S.; Touhami, K., **“Aggregation kinetic and temperature optimum of an EDTA-dependent pseudothrombocytopenia,”** *Clinical Chemistry and Laboratory Medicin*, 2020.
- [16] Akisin, Y.A.; Akar, N., **“Platelet Satellitism,”** *Turkish Journal of Haematology*, vol. 37, n° 1, pp. 55-56, 2020.
- [17] Ahmed, M., **“Acute cholangitis - an update,”** *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, vol. 9, n° 1, pp. 1-7, 2018.