



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Michael David Lameiras dos Santos

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Maria Celeste Fernandes Lopes e pela Dra. Maria Beatriz Godinho Tomaz dos Santos e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho de 2020

Michael David Lameiras dos Santos

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

**Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas,
orientado pela Professora Doutora Maria Celeste Fernandes Lopes e pela
Dra. Maria Beatriz Godinho Tomaz dos Santos e apresentado à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra**

Julho de 2020

Agradecimentos

O estágio em Labeto Centro de Análises Bioquímicas assume-se como o culminar de mais uma etapa da minha vida académica.

Em primeiro lugar, agradeço ao Laboratório na pessoa da Dr.^a Maria Beatriz Godinho Tomaz dos Santos que me recebeu de forma carinhosa que teve muita paciência, que me apoiou e me tratou bem e respeitosamente.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e a todos os Professores do curso, por me terem recebido e tratado de uma forma extraordinária, pelo apoio durante estes anos e pela forma recetiva como que me receberam sempre.

Agradeço à minha família e muito em especial à minha Esposa pela paciência, pelo esforço, pelo apoio, por ter aguentado o barco como aguentou em fases muito complicadas. A ti, Teresa, obrigado por sempre acreditares em mim e por estares sempre ao meu lado.

Por último, e mais importante, agradeço ao meu filho Afonso, por ter sido a minha fonte de inspiração, de força, de motivação e de querer e sobretudo por ter sido o principal prejudicado pela minha ausência em muitos momentos que tive que dedicar ao Mestrado.

Obrigado Filho!

Abreviaturas

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

Ag. – Antígeno

AGH – antiglobulinas humanas

APCER – Associação Portuguesa de Certificação

ARN – Ácido Ribonucleico

ATB – Antibiograma

ATCC – *American Type Culture Collection*

BAAR – Bacilos Ácido-Álcool Resistentes

BASO – Basófilos

BK – Bacilo de Koch

CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média

CLSI – *Clinical & Laboratory Standards Institute*

COS – *Columbia agar Sheep Blood*

CPSE – chromID® CPS® Elite

CQI – Controlo de Qualidade Interno

DGS – Direção Geral de Saúde

EDTA – Ácido EtilenoDiamino Tetra-Acético

EOS – Eosinófilos

ESP – Esmregaço Sangue Periférico

EUCAST – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

GN – Gram Negativo

GP – Gram Positivo

GV – Glóbulos Vermelhos

Hb – Hemoglobina

HbA1c – Hemoglobina Glicada

HCM – Hemoglobina corpuscular média

Hg – Hemoglobina

Ht – Hematócrito

IgG – Imunoglobulina G

INR – *International Normalized Ratio*

INSA – Instituto Nacional de Saúde

ISI – Índice de Sensibilidade Internacional

ISO – *International Standardization Organization*

ITU – Infecção do trato urinário
LYM – Linfócitos
MONO – Monócitos
MRSA – *S. aureus* meticilina resistente
MSA – *Manitol Salt Agar*
NAD – Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NEQAS – *National External Quality Assessment Site*
NEU – Neutrófilos
NH – *Neisseria / Haemophilus*
NK – *Natural Killer*
PDW – Dispersão do Volume Plaquetar
PLT – Plaquetas
RBC – *Red Blood Cell*
RDW – Dispersão de volume Eritrocitário
Rh – *Rhesu*
rpm – rotações por minuto
SINAVE – Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica
STEC – *Escherichia coli* produtora de toxina shiga
TAD – Teste de antiglobulina direto
TAI – Teste de antiglobulina indireto
TP – Tempo de Protrombina
TTP – Tempo de Tromboplastina Parcial
UFC – Unidades Formadoras de Colónias
VCAT – Vancomicina Colistina Anfotericina Trimetropim
VCM – Volume corpuscular médio
VPM – Volume Plaquetar Médio
VS – Velocidade de Sedimentação
WBC – *White Blood Cell*
YST – *yeast*

Índice

Agradecimentos	iii
Abreviaturas	v
1. Introdução	1
2. Fluxo de amostras	2
2.1. Fase pré-analítica.....	2
2.2. Fase analítica	3
2.3. Fase pós-analítica	3
3. Exames hematológicos básicos	4
3.1. Hemograma	5
3.2. Esfregaço de sangue periférico (ESP).....	6
3.3. Glóbulos Vermelhos	6
3.4. Os leucócitos.....	8
3.5. As plaquetas.....	10
3.6. Contagem de Reticulócitos.....	10
3.7. Velocidade de sedimentação	11
4. Patologias das células sanguíneas	13
4.1. Anemias	13
4.2. Doenças leucocitárias	16
5. Provas de avaliação da hemostase	18
5.1. Tempo de protrombina (TP) e <i>International Normalized Ratio</i> (INR).....	20
5.2. aPTT:Tempo de tromboplastina parcial ativada	20
5.3. Fibrinogénio e Antitrombina III.....	21
6. Imuno-hematologia	21
6.1. Grupo Sanguíneo	21
6.2. Testes de Antiglobulina Directo e Indirecto	23
7. Controlo de qualidade – Hematologia	24
8. Caso Clínico	25
9. Microbiologia	27
9.1. Colorações usadas em Microbiologia.....	27
9.2. Meios de cultura	28
9.3. Amostras analisadas	30
9.3.1. Urina.....	30
9.3.2. Urocultura	31
9.3.3. Fezes.....	32
9.3.4. Coprocultura	33
9.3.5. Exame parasitológico	34
9.4. Exsudados.....	35

9.4.1.	Pesquisa de <i>Streptococcus</i> do grupo B.....	35
9.4.2.	Exsudado vaginal.....	35
9.4.3.	Exsudado uretral.....	38
9.4.4.	Exsudado faríngeo.....	39
9.4.5.	Exsudado auricular.....	39
9.4.6.	Exsudado Nasal.....	40
9.4.7.	Exsudado purulento.....	41
9.5.	Expetoração.....	41
9.6.	Amostras para exames micológicos.....	42
9.7.	Identificação bacteriana e Antibiograma.....	43
10.	Controlo de Qualidade – Microbiologia.....	44
11.	Caso Clínico.....	45
12.	Bioquímica.....	46
13.	Imunologia.....	47
14.	Conclusão.....	49
	Bibliografia.....	50
	Anexo I.....	54

I. Introdução

O estágio no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra é um estágio profissionalizante que permite ao aluno adquirir diversas competências que complementam a formação adquirida ao longo do curso, assim como a prática laboratorial necessária para iniciar a vida profissional num laboratório. As Análises Clínicas são uma área extremamente vasta e em contínua evolução, permitindo o estudo de diversas patologias, deteções mais precoces das mesmas e resultados cada vez mais rápidos. A crescente expansão desta área tem levado à automatização dos laboratórios, permitindo a análise de mais amostras num menor espaço de tempo, a repetibilidade das mesmas, a sua rastreabilidade e um controlo de qualidade mais apertado. Este estágio foi realizado no Laboratório Labeto, Centro de Análises Bioquímicas, S.A., onde tive a oportunidade de passar por todas as valências que compõem a vasta área das Análises Clínicas: Hematologia, Microbiologia, Bioquímica, Endocrinologia, Imunologia e Biologia Molecular. Neste relatório vou aprofundar detalhadamente as áreas de Hematologia e Microbiologia, assim como o controlo de qualidade realizado nestes setores.

Caracterização do laboratório Labeto, Centro de Análises Bioquímicas S.A.

Fundado em 1974, o Laboratório Labeto, Centro de Análises Bioquímicas, S.A., situa-se na Avenida Marquês de Pombal, lote 2, 1º Apartado, Leiria, sob a direção técnica da Dra. Beatriz Olinda de Oliveira Santos Godinho Tomaz, especialista em Análises Clínicas e fundadora do Laboratório, juntamente com o Dr. Amado Elias Tomaz. Pertencendo ao Grupo Beatriz Godinho Saúde, ao qual pertencem também os Laboratórios de Análises Clínicas Laboratório José Manuel Chau (Coimbra) e o Laboratório Seialab (Seia), a empresa Polidiagnóstico, Polidiagnóstico Empresas, o Laboratório Tomaz, a Clínica Luís Lourenço e uma vasta rede de farmácias. O grupo possui mais de 130 postos de colheitas, sendo que as amostras de cerca de 90, são transportadas e analisadas no Laboratório Labeto, assim como amostras provenientes de lares, clínicas e de colheitas feitas ao domicílio.

Diariamente, o laboratório tem em média 1200 utentes, o que evidencia o elevado prestígio e notabilidade que este laboratório tem na área das Análises Clínicas na região Centro. O Labeto possui também dupla certificação, segundo a Norma ISO 9001:2015, do Sistema de Gestão da Qualidade pela APCER, desde 2003 e a fiabilidade dos resultados é comprovada pelo uso constante de controlos internos e externos e pelo bom desempenho obtido nos Programas de Avaliação Externa de Qualidade. O laboratório funciona de segunda a sábado,

estando dividido nas secções de: Bioquímica/Endocrinologia/Imunologia (Core Lab.), Serologia Infeciosa, Urinálise, Autoimunidade, Hemostase, Microbiologia, Hematologia e Biologia Molecular e Genética.

2. Fluxo de amostras

2.1. Fase pré-analítica

Durante toda a duração do meu estágio estive num posto de colheitas no período da manhã, onde participei na fase pré-analítica, fazendo a receção dos utentes, registando os seus processos no sistema informático e procedendo à colheita das amostras biológicas correspondentes. Esta fase inicia-se com a chegada do utente ao posto de colheitas, onde retira uma senha e aguarda pela sua vez na sala de espera. Quando a sua senha é chamada, este é atendido pelo/a rececionista, que faz a inscrição do utente no sistema informático, confirmando os dados do mesmo e fazendo questões relacionadas com as análises pedidas (jejum, medicação, gravidez, etc.), colocando esta informação no processo do utente, de modo a estar acessível ao laboratório onde as análises serão realizadas.

É atribuído um código interno ao utente com o código de barras correspondente, que é impresso em etiquetas, com o sufixo relativo ao setor e ao tipo de análise a ser efetuada (U0 – urina, L0 – hemograma, B0 – bioquímica, etc.), modo a assegurar a rastreabilidade das amostras. O utente é chamado conduzido à sala de colheitas, são confirmados novamente os dados do utente e as análises a realizar, de modo a preparar o material necessário à colheita e à correta identificação dos tubos/contentores específicos para cada análise, como indicado na Tabela I [1]. Proceda-se então à colheita das amostras, sendo que algumas análises ao serem registadas no sistema informático emitem um alerta, que informa o técnico que estas necessitam de um tratamento específico, ainda no posto de colheitas, como por exemplo, retração do coágulo, centrifugação e separação do soro, ou proteção da luz.

Tabela I. Tubos para colheita de sangue, respetiva constituição e utilização na prática laboratorial [1].

Tubo	Anticoagulante	Amostra usada	Utilização
Tampa vermelha	Sem anticoagulante	Soro	Bioquímica e Imunologia
Tampa lilás	EDTA K3 (1,5 +/- 0,25 mg por ml sangue)	Sangue Total	Hemograma, V.S. e HbA1C
Tampa azul	Citrato Sódico (1:9)	Plasma	Estudos da Coagulação
Tampa verde	Heparina Lítio	Plasma	Bioquímica
Tampa azul escura	Isento de Metais	Soro	Elementos vestigiais

Após a colheita das amostras, as mesmas são transportadas em malas térmicas até ao laboratório. As malas térmicas têm um termómetro incorporado que regista a temperatura, que é depois registada num documento de qualidade assim que a mala chega ao laboratório. Neste, existe uma zona de triagem onde as amostras são separadas e levadas para a secção do laboratório onde a análise correspondente será realizada. Em cada secção é dada a entrada da amostra respetiva no sistema informático. O técnico da secção verifica as condições da amostra, em termos de quantidade e qualidade, para averiguar se existem não conformidades (identificação incorreta do tubo, falta de produto para análise, agregados plaquetares, etc.) que, caso existam, terão de ser investigadas e registadas em documento próprio, podendo invalidar a análise em questão, sendo necessária nova colheita da amostra.

2.2. Fase analítica

Com tudo devidamente confirmado e os controlos de qualidade interno passados e validados (CQI) inicia-se a fase analítica, onde as amostras são distribuídas pelas diferentes valências e inseridas no aparelho que irá realizar a análise pedida, lendo o código de barras e automatizando o trabalho (quando não são analisadas manualmente). Nas análises realizadas manualmente (exemplo: teste rápido da mononucleose infecciosa, teste de Weil-Felix, etc.), as amostras são separadas para suportes específicos e depois são realizadas seguindo uma lista de trabalho.

2.3. Fase pós-analítica

Segue-se a fase pós-analítica, em que é feita a validação dos resultados. Os aparelhos enviam diretamente os resultados para o sistema informático, onde um técnico superior, valida os resultados tendo em conta os valores de referência e o histórico clínico do utente. Quando surge um valor discordante ou de difícil interpretação é feita a repetição da análise da mesma amostra ou até pedida nova colheita ao utente, quando a amostra não está nas condições ideais ou para confirmação de resultado. Após validação analítica, os resultados são validados por um Especialista em Análises Clínicas ou pela Diretora Técnica, que irá realizar a validação biopatológica, tendo em conta o histórico do utente e o quadro clínico do mesmo. Por fim, os boletins de resultados são impressos e colocados em envelopes, no caso de envio para o posto de colheitas, centro de saúde ou medicina do trabalho, ou são enviados por correio eletrónico, a pedido do utente.

3. Exames hematológicos básicos

A Hematologia de rotina é uma das áreas mais requisitadas pelos clínicos, podendo evidenciar-se as seguintes análises: Hemograma, Plaquetas, Velocidade de Sedimentação e Tempo de Protrombina [2].

Durante a minha permanência neste setor tive a oportunidade de realizar hemogramas, análise de esfregaços sanguíneos, contagem de reticulócitos, determinação de tempo de protrombina, parcial de tromboplastina e trombina, doseamento de fibrinogénio, determinação da velocidade de sedimentação globular. Também efetuei a classificação do grupo sanguíneo sistema ABO e Rhesus.

O hemograma consiste na análise quantitativa e qualitativa dos elementos figurados contidos em 1 mm³ de sangue: contagem de eritrócitos, leucócitos, plaquetas, concentração de hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM, CHCM, RDW e fórmula leucocitária [3]. Avalia-se não só a quantidade dos elementos da fórmula leucocitária de forma relativa (percentagem), mas também de forma absoluta [3]. Para se efetuar qualquer tipo de interpretação é necessário atender à forma absoluta, uma vez que é a única que tem valor de diagnóstico.

Para além de ser efetuado como exame de rastreio, o hemograma é de grande ajuda para o diagnóstico de muitas doenças, refletindo igualmente a capacidade do organismo em reagir frente a determinada doença, constituindo um indicador dos progressos do doente em determinados estados patológicos, tais como infeções e anemias.

Estas análises nomeadamente o hemograma e as plaquetas são realizadas em aparelhos automatizados, no Laboratório Labeto é o Sysmex XN-1000.

No Sysmex XN-1000, utilizam-se amostras de sangue total colhido em tubos de K₃EDTA.

Para um cliente com estes pedidos (Hemograma, Plaquetas), a amostra dentro do aparelho será dissociada em 6 canais diferenciados:

Canal HGB

Canal RBC/PLT

Canal 4DIFF

Canal WBC/BASO

Canal IG

Canal RET/PLT-O

Tabela 2. Resumo das Metodologias do contador Sysmex XN-1000 [4].

Parâmetro	Definição	Metodologia
Hb	Concentração de hemoglobina	Colorimetria – Surfactante Laurilsulfato de Sódio
GV	Contagem de eritrócitos Diminuição na contagem – eritropenia Aumento na contagem – eritrocitose	Impedância e focagem hidrodinâmica
Ht	Hematócrito Volume de massa eritroide. Correlaciona-se com a viscosidade sanguínea.	Impedância e focagem hidrodinâmica
VCM	Volume corpuscular médio Determina o volume médio de cada eritrócito	Calculado (HCTx10)/RBC
HCM	Hemoglobina corpuscular média Conteúdo médio de hemoglobina por eritrócito.	Calculado (HGB/RBC) x 10
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média Traduz a percentagem de hemoglobina que está contida em cada eritrócito.	Calculado (Hb/Ht, em g/dl)
RDW	Dispersão de volume eritrocitário Expressão numérica da anisocitose	Derivado do histograma
WBC	Contagem de leucócitos Aumento da contagem - leucocitose Diminuição da contagem – leucopenia	Citometria de fluxo fluorescente
NEU, LYN, MONO, EOS, BASO (%)	Contagem de neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos em %.	Citometria de fluxo fluorescente
NEU, LYN, MONO, EOS, BASO (#)	Contagem absoluta de neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos	Calculado (valor da população em %*GB/100)
PLT	Contagem de plaquetas Aumento na contagem - trombocitose Diminuição na contagem - trombocitopenia	Impedância e focagem hidrodinâmica
VPM	Volume plaquetar médio Útil na avaliação do tamanho e morfologia das plaquetas	Derivado do histograma
PDW	Dispersão do volume plaquetar Traduz o índice de variação no tamanho das plaquetas	Derivado do histograma
Reticulócitos		Luz dispersa frontal e fluorescência lateral

3.1. Hemograma

O hemograma é uma análise que é composta pela contagem das diferentes células maduras sanguíneas e pela determinação de várias constantes como o hematócrito, a concentração de hemoglobina corpuscular média, entre outros. A prescrição deve obrigatoriamente conter dados sobre diagnóstico/informação clínica, sexo do utente e data. São usadas amostras de sangue total colhido em tubo com EDTA e avaliados vários parâmetros

nomeadamente glóbulos vermelhos, hemoglobina, glóbulos brancos, plaquetas, etc. (Tabela 1) [5].

O hemograma é a análise mais requisitada no Labeto e os resultados são analisados de acordo com os valores de referência do laboratório (Anexo I). O hemograma é muito importante para avaliação de diversas situações, como no diagnóstico e evolução de doenças hematológicas, deteção de quadros infecciosos e na monitorização terapêutica. A associação dos dados quantitativos, aspetos morfológicos e conhecimento fisiopatológico das alterações da hematopoiese são importantes para um diagnóstico preciso da patologia [5].

No que diz respeito ao hemograma, diariamente é realizado um nível de controlo diariamente (alto, baixo ou normal alternadamente) antes de proceder às análises dos utentes de modo a garantir que os resultados obtidos são de confiança.

3.2. Esfregaço de sangue periférico (ESP)

Com o desenvolvimento de instrumentos automatizados sofisticados para contar e caracterizar as células sanguíneas, os esfregaços de sangue periférico (ESP) corados são realizados em menor número. No entanto, a realização de um esfregaço sanguíneo é importante para esclarecer alguns resultados do hemograma obtidos instrumentalmente. A Direção Geral de Saúde (DGS) recomenda a observação morfológica das células sanguíneas em várias situações, nomeadamente diminuição da concentração de hemoglobina (anemia), aumento ou diminuição do volume globular médio eritrocitário (macrocitose e microcitose, respetivamente), alterações na fórmula leucocitária, aumento ou diminuição na contagem de plaquetas (trombocitose e trombocitopenia, respetivamente) [6].

Depois de seco o esfregaço é fixado com metanol e corado por May-Grünwald-Giemsa. O azul de metileno, corante básico, cora apenas estruturas basófilas (ácidos nucleicos, basófilos neutrófilos), a eosina, corante ácido, cora estruturas acidófilas (hemoglobina e granações dos eosinófilos) [7].

No ESP podem ser observados Glóbulos Vermelhos, Glóbulos Brancos e Plaquetas.

3.3. Glóbulos Vermelhos

Os glóbulos vermelhos são células anucleadas, possuem um citoplasma acidófilo devido à presença de hemoglobina. A membrana é constituída por actina, anquirina, proteínas de banda 3, banda 4.1, banda 4.2 e espectrina o que lhes confere a forma bicôncava. Em situações patológicas podem ocorrer variações no tamanho (anisocitose), forma (poiquilocitose), coloração, presença de inclusões, etc. (Figura 1) [8].

Os eritrócitos apresentam várias formas que estão associadas a patologias específicas ou a situações de infecção ou inflamação. Durante o estágio aquelas com que mais tive contato foram acantócitos, esferócitos, drepanócitos, dacriócitos, células em alvo e estomatócitos (Figura 1).

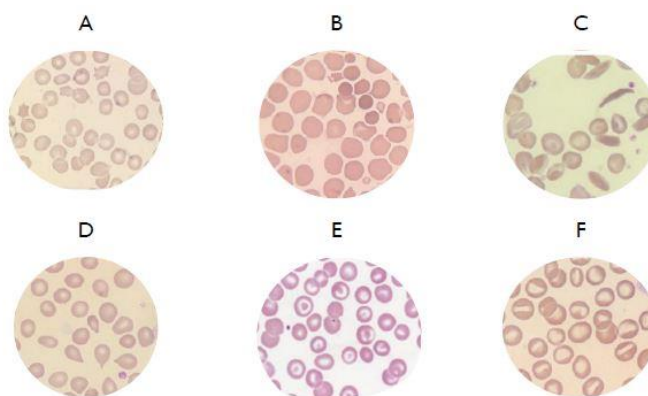


Figura 1. Alterações morfológicas dos eritrócitos onde estão representados Acantócitos (A), Esferócitos (B), Drepanócitos (C), Dacriócitos (D), Células em alvo (E) e Estomatócitos (F) [9].

Os acantócitos são eritrócitos com espículas e que geralmente estão associados a patologias hepáticas em que há alteração no metabolismo do colesterol, importante na manutenção da estabilidade da membrana celular [9].

Os esferócitos resultam de alterações genéticas nas proteínas de banda 3, banda 4.1, anquirina ou espectrina, ou da sensibilização dos eritrócitos por anticorpos específicos para as proteínas de superfície. Perdem a maleabilidade e diminuem o seu tamanho devido à forma esférica que adquirem [9].

Os drepanócitos, células em foice, resultam de uma alteração qualitativa da hemoglobina, pela substituição de um aminoácido nas cadeias β da hemoglobina, levando à formação de hemoglobina S. Os eritrócitos são mais rígidos e, por isso, não conseguem exercer a sua função. São característicos da drepanocitose ou anemia falciforme [9].

Os dacriócitos são células em forma de lágrima que aparecem devido a deformações na membrana do glóbulo vermelho e que estão associadas a situações de anemia [10].

As células em charuto são células muito características de formato comprido e achatado, que aparecem frequentemente nas anemias sideropénicas e permitem ajudar no diagnóstico das mesmas [9].

As células em alvo são células que possuem uma zona descolorida em redor de um ponto corado e concentrado a nível central, que resultam principalmente de problemas hepáticos [9].

Os estomatócitos são células que apresentam uma depressão descolorida e central e o seu aparecimento pode resultar de alterações da permeabilidade membranar aos iões. Estas

células estão frequentemente associadas ao consumo crônico de álcool ou de problemas renais [9].

3.4. Os leucócitos

Os leucócitos são responsáveis pela defesa do nosso organismo contra microrganismos estranhos ou moléculas tóxicas. Classificam-se em cinco tipos: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos. Enquanto determinadas células são responsáveis por processos de fagocitose (neutrófilos e monócitos), outras estão mais envolvidas na liberação de moléculas citotóxicas e no reconhecimento de antígenos ou na produção de anticorpos (linfócitos) [8].

Os Neutrófilos atuam na defesa do organismo contra processos infecciosos, através de algumas propriedades que lhes são próprias como motilidade, quimiotaxia, fagocitose e ação bactericida [10]. São células com citoplasma acidófilo, com núcleo lobulado com cromatina densa (3 a 5 lóbulos) (Figura 2) [7].

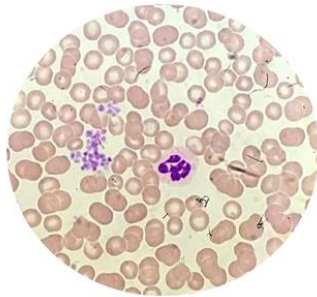


Figura 2. Observação ao microscópio ótico de neutrófilos em esfregaço de sangue periférico após coloração May-Grünwald-Giemsa (ampliação 1000x).

Os Eosinófilos aumentam em resposta a estímulos imunológicos como processos alérgicos e infecções parasitárias. São células com citoplasma acidófilo, núcleo habitualmente bilobado e com cromatina densa. É frequente a presença de grânulos acidófilos por todo o citoplasma (Figura 3) [2,7].

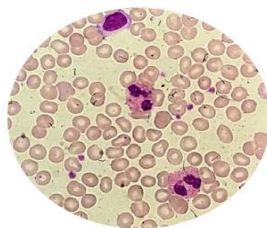


Figura 3. Observação ao microscópio ótico de eosinófilos em esfregaço de sangue periférico após coloração May-Grünwald-Giemsa (ampliação 1000x).

Os Basófilos são responsáveis pela regulação da resposta a processos inflamatórios locais [11]. Têm geralmente tamanho semelhante a um neutrófilo [10]. São células com citoplasma acidófilo, com núcleo lobulado (2 a 3 lóbulos) e cromatina densa. Estão também presentes vários grânulos grosseiros distribuídos por todo o citoplasma sendo que por vezes sobrepõem-se ao núcleo (Figura 4) [7].

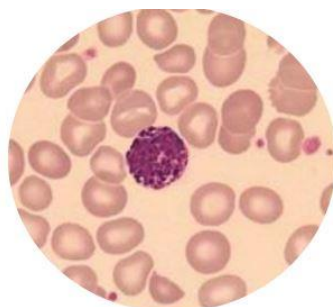


Figura 4. Observação ao microscópio ótico de um basófilo em esfregaço de sangue periférico após coloração May-Grünwald-Giemsa (ampliação 1000x).

Os Monócitos são os precursores dos macrófagos. Integram a imunidade tanto humoral quanto a celular [10]. São responsáveis pela fagocitose de bactérias, parasitas e fungos [11]. São células com citoplasma basófilo de tamanho e forma variáveis, com núcleo habitualmente em forma de U e com malha cromatínica aberta, podendo existir vacúolos na célula (Figura 5) [7].

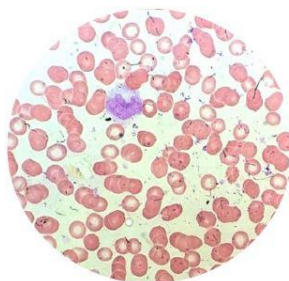


Figura 5. Observação ao microscópio ótico de monócito em esfregaço de sangue periférico após coloração May-Grünwald-Giemsa (ampliação 1000x).

Os Linfócitos são células normalmente pequenas, com citoplasma basófilo, núcleo sem lóbulos e com cromatina densa. Têm elevada relação núcleo/citoplasma e não possuem grânulos específicos (Figura 6) [7].

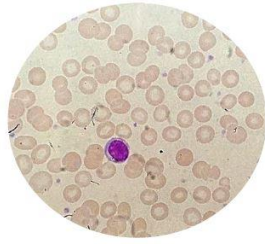


Figura 6. Observação ao microscópio ótico de um linfócito em esfregaço de sangue periférico após coloração May-Grünwald-Giemsa (ampliação 1000x).

Linfócitos B maturam e originam plasmócitos – células produtoras de anticorpos. Linfócitos T atuam na defesa contra vírus, antígenos estranhos e tumores [11]. Os linfócitos B e T são morfologicamente iguais. Os Linfócitos ativados têm uma relação núcleo/citoplasma menor do que os linfócitos normais, malha cromatínica aberta e com uma organização mais irregular. O citoplasma é basofílico e surge com frequência a envolver os eritrócitos (Figura 7) [11].

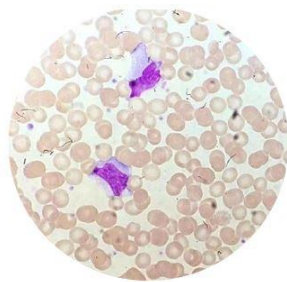


Figura 7. Observação ao microscópio de linfócitos ativados em esfregaço de sangue periférico, coloração May-Grünwald-Giemsa (ampliação 1000x).

3.5. As plaquetas

As plaquetas resultam da fragmentação do megacariócito, são de tamanho muito reduzido, forma irregular e possuem grânulos. Na corrente sanguínea assumem uma relevante importância na hemóstase. Relativamente à população plaquetar no ESP, podemos encontrar diferentes tipos de população, sendo que a anisocitose plaquetar é bastante comum, seguida pela presença de plaquetas gigantes [12].

3.6. Contagem de Reticulócitos

A contagem de reticulócitos permite avaliar a eficácia da medula na produção dos eritrócitos [6]. Os reticulócitos são precursores dos glóbulos vermelhos. À medida que se dá a maturação dos eritrócitos, o núcleo vai ficando mais condensado até que desaparece. Após

a perda do núcleo, estes precursores permanecem na medula óssea durante 2 a 3 dias antes de entrarem na circulação periférica. Durante este período de permanência na medula e o primeiro dia em circulação estes eritrócitos imaturos são denominados reticulócitos. Apesar destas células já não terem núcleo contêm ribossomas com ARN que se torna visível ao microscópio ótico quando corado com coloração específica. A coloração utilizada para fazer a observação e contagem dos reticulócitos utiliza azul-de-metileno NOVO mas pode também ser usado o azul brilhante de cresil. A mistura do corante com o sangue é incubada a 37°C, precipitando o ARN ribossomal (Figura 8). São contados 1000 eritrócitos e respetivo número de reticulócitos [8]. Sob estímulo da eritropoietina, que pode ocorrer em casos de perda sanguínea, a medula aumenta o número de reticulócitos que são lançados na corrente sanguínea [8].

Quando se estuda uma anemia e a sua provável etiologia, a contagem de reticulócitos é um exame de 1ª linha, a par das constantes globulares e do estudo morfológico dos eritrócitos. Permite diagnosticar se se trata de uma anemia regenerativa, em que há estimulação da medula e há uma resposta medular com aumento do número de reticulócitos e consequente aumento da produção de eritrócitos, ou de uma anemia arregenerativa, em que há um defeito na produção dos eritrócitos e não há um aumento do número de reticulócitos [6].

O resultado é dado em percentagem e em valor absoluto tendo como gama de referência 0,5 a 1,5% ou $25 \times 10^9/L$ a $90 \times 10^9/L$ em adultos [6,8,13].

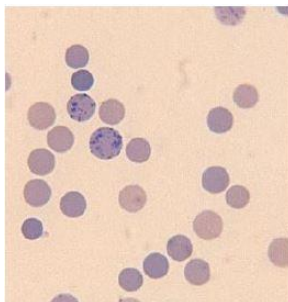


Figura 8. Observação ao microscópio de reticulócitos corados com brilhante de cresil [14].

3.7. Velocidade de sedimentação

A velocidade de sedimentação corresponde à velocidade a que ocorre separação entre os glóbulos vermelhos e o plasma, que é a parte líquida do sangue, pela ação da gravidade.

A determinação da VS é realizada recorrendo a uma pipeta de Westergren com uma graduação de 0 a 200 mm, com diâmetro interno de 20,5 mm e capacidade de 1 ml. A pipeta é cheia com sangue total, colocada no suporte na vertical e é feita a leitura após uma hora

através da medição da altura da coluna correspondente ao plasma livre de células. O resultado é dado em mm / 1ª hora [10].

No laboratório Labeto, usa-se um método automatizado para medição da velocidade de sedimentação: Test I THL.

O Test I é um analisador automático que consiste num microfotómetro capilar para a determinação da velocidade de sedimentação dos eritrócitos. Baseia-se no princípio da fotometria capilar de fluxo (análise cinética). Tem uma capacidade máxima para 60 amostras/ciclo.

Após agitação, a amostra é automaticamente transferida para um capilar e mantido a 37°C. O dispositivo usa feixes infravermelhos com um comprimento de onda 950 nm que atravessam o capilar. O detetor de fotodíodo deteta o feixe exterior e regista o sinal por um período de tempo fixo, o que permite a construção da curva de sedimentação para cada amostra. Através de um modelo de regressão linear, o sinal é transformado num valor comparável com os valores de Westegren.

Interferências: Por exemplo, em casos de anemia que alterem a forma das hemácias e a sua capacidade de agregação, este teste pode apresentar um valor abaixo do que seria o esperado. A inclinação do tubo, variações na temperatura e presença de microcoágulos alteram a os valores normais de hemossedimentação. Este parâmetro está aumentado nos processos inflamatórios, infecciosos e neoplásicos. Altera-se também nas doenças autoimunes, enfarto de miocárdio, gravidez e hipotireoidismo, sendo, portanto, um exame inespecífico [15].

A velocidade de sedimentação reflete pois, principalmente, as modificações que sofrem as proteínas plasmáticas, modificações essas que geralmente resultam de infeções agudas ou crónicas, tumores, doenças degenerativas e em certas situações de stress fisiológico, como a gravidez. A velocidade de sedimentação é uma resposta inespecífica do organismo a uma deterioração tecidual, sendo indicativa da sua presença, embora não avalie a sua gravidade [15].

A determinação da velocidade de sedimentação possui três aplicações principais: para ajudar a detetar e a estabelecer o diagnóstico de distúrbios inflamatórios ou para excluir a possibilidade dessas doenças; como meio de seguir o curso clínico ou o tratamento de doenças com componente inflamatório, como a artrite reumatoide; para demonstrar ou confirmar a presença de doença orgânica oculta, quando o doente é sintomático mas carece de evidências laboratoriais ou físicas definitivas de doença orgânica ou quando o doente é assintomático [15].

4. Patologias das células sanguíneas

Ao observar uma lâmina é importante saber o que deve ser valorizado. Podem existir alterações das células sanguíneas em todas as amostras de sangue, por isso é importante ter noção: se estamos a observar uma alteração que é reprodutível por todo o esfregaço ou se apenas aparece em alguns campos deste, saber como foi feita a recolha e processamento da amostra, informações sobre o estado clínico do doente e se estamos perante um esfregaço de um recém-nascido, de uma criança, de um adulto, de um idoso ou de uma grávida. Todas estas informações são importantes no momento da análise do esfregaço sanguíneo de modo a saber que alterações devem ser valorizadas e posteriormente reportadas aos clínicos.

4.1. Anemias

A palavra anemia é originária do Grego e significa “sem sangue”. Nos tempos atuais a definição de anemia surge como “qualquer condição caracterizada pela diminuição da concentração de hemoglobina” [16].

A hemoglobina é uma proteína de estrutura quaternária constituída por uma parte globínica que é dividida em 4 cadeias proteicas e uma parte não proteica (grupo prostético) constituída por 4 grupos heme que têm capacidade para transportar 4 iões de ferro na sua forma de ferro ferroso (Fe^{2+}) que permitem a ligação da hemoglobina ao oxigénio [16].

As principais hemoglobinas no adulto são a Hb A ($\alpha_2\beta_2$), 96% a 98%, Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$), 1,5% a 2,3% e Hb F ($\alpha_2\gamma_2$), 0,5% a 0,8%. A sua principal função é a oxigenação dos tecidos pelo que a sua diminuição vai ter efeitos nefastos nos mesmos [16].

Os sintomas que surgem em casos de anemia são inespecíficos e dependem do ritmo de descida da Hb. Se a anemia se instala rapidamente, como acontece em casos de hemorragia aguda o doente pode entrar em choque ainda que apresente um Ht normal. Se a hemoglobina descer para a mesma concentração de uma forma insidiosa, a anemia é tolerada de uma forma melhor porque há um aumento compensatório dos ritmos cardíaco respiratório e uma diminuição da afinidade da Hb para o oxigénio (O_2) [16].

Em termos fisiopatológicos as anemias podem ser devidas a alteração da produção dos GV, destruição aumentada dos GV ou aumento da perda de GV. Com base nas constantes eritrocitárias (HCM e VCM) a anemia pode ser classificada em hipocrómica, normocrómica e hiperocrómica, microcítica, normocítica e macrocítica (Tabela 3).

Tabela 3. Caracterização dos tipos de anemia [7].

Anemia	Constantes	Causas
Microcítica Hipocrômica	VCM <80 fl HCM <27 pg	Anemias sideropénicas Anemias sideroblásticas Talassemias
Normocítica Normocrômica	80<VGM<96 fl 27<HCM<33 pg	Anemias das doenças crónicas Anemias hemolíticas
Macrocítica	VCM>96 fl	Deficiências em vitamina B12 e ácido fólico Anemia perniciosa Medicamentos Álcool
Hiperocrômica	HCM>33 pg	Esferocitose hereditária

Anemia hipocrômica e microcítica

A hemoglobina é formada por dois pares de cadeias globínicas e um grupo heme constituído por um ião de ferro num anel de protoporfirina. Quando há falta de ferro para a formação do grupo heme ou há poucas cadeias globínicas disponíveis, a síntese da hemoglobina é afetada, os glóbulos vermelhos são mais pequenos (microcitose) e menos corados (hipocromia). Entre as causas de hipocromia estão a sideropenia, talassemia, alterações congénitas do metabolismo do heme, etc. [16].

Anemia sideropénica

A anemia sideropénica é a forma de anemia mais comum. Nestes casos é iniciado um tratamento com ferro oral em dose adequada, caso não se verifiquem melhorias é porque há perdas abundantes ou má absorção. Quando não há resposta a este tratamento a avaliação de outro parâmetro mostra-se vantajosa. Se a ferritina for normal ou elevada deve-se suspeitar de uma talassemia ou de uma anemia das doenças inflamatórias, se ferritina está reduzida a suspeita incide na possível má absorção do ferro [16].

Talassemias

As talassemias denominam-se α ou β e surgem quando há redução ou ausência da síntese de uma das cadeias globínicas que constituem a Hb [16].

β -Talassemias: A síntese de cadeias globínicas β depende da expressão de um gene localizado no cromossoma 11. Este gene pode sofrer mutações que impossibilitem a síntese de cadeias ou que reduzam a quantidade de cadeias sintetizadas. Na β -talassémia minor só um dos alelos do gene está mutado (heterozigotia), Hb A₂ aumenta (>3,5%) e a Hb F mantem-se

normal ou aumenta ligeiramente. Na β -talassémia intermédia os dois alelos do gene estão mutados (homozigotia) mas ainda sintetizam algumas cadeias globínicas β , a HbA₂ e Hb F estão elevadas, o VCM e a HCM estão baixos, o RDW e taxa de reticulócitos elevados. Se não houver síntese destas cadeias, não há Hb A (ou há uma quantidade muito escassa), a Hb F está elevada e a anemia é grave, dependente de transfusões desde o primeiro ano de vida [16].

α -Talassemias: Para a síntese das cadeias globínicas α há dois genes homólogos, α_1 e α_2 , no cromossoma 16. As α -talassemias resultam, mais frequentemente, da deleção de um ou dos dois genes num dos alelos [16].

Alterações no metabolismo do heme

As alterações no metabolismo do heme levam ao aparecimento de doenças caracterizadas por anemia hipocrômica e microcítica com RDW elevado, dimorfismo acentuado a nível dos GV, ferritina e saturação de transferrina elevadas. As principais complicações estão associadas a sobrecarga de ferro, o que obriga a monitorização regular e tratamento quelante [16].

Anemia macrocítica

As anemias macrocíticas podem ser megaloblásticas (deficiências de vitamina B12 ou de ácido fólico) ou não megaloblásticas [16].

Anemia megaloblástica

Os défices de vitamina B12 e de ácido fólico afetam a síntese do ADN, com repercussão nos precursores eritróides, mielóides e megacariocíticos, de que resulta anemia.

No sangue periférico observam-se macrócitos, pontuado basófilo e neutrófilos hipersegmentados [16].

As causas mais frequentes são a deficiência nutricional de folatos e a má absorção da vitamina B12 por défice de fator intrínseco (FI). Em casos de ausência completa de FI a anemia denomina-se Anemia perniciosa [16].

Anemia não- megaloblástica

Uma macrocitose, com ou sem anemia, pode ocorrer no decurso de doença hepática, em casos de alcoolismo, displasia da medula óssea, etc. Ao contrário das anemias megaloblásticas, nestas patologias não são evidentes alterações megaloblásticas na medula, nem neutrófilos hipersegmentados no sangue periférico [16].

Anemia normocítica

Algumas das causas de anemia normocítica são hemorragia aguda, doença inflamatória crônica, doença renal, etc. Uma anemia pode ser normocítica no estágio inicial, e evoluir para micro ou, menos frequentemente, para macrocítica. Quando há associação de vários fatores etiológicos, por exemplo nas patologias do tubo digestivo com má absorção de ácido fólico e/ou da vitamina B12 e carência de ferro a anemia pode ser normocítica com RDW elevado [16].

4.2. Doenças leucocitárias

As alterações leucocitárias podem ser neoplásicas ou não neoplásicas. Por sua vez, as não neoplásicas podem ser quantitativas, qualitativas ou ambas. Do ponto de vista qualitativo, o leucócito pode exibir maior grau de imaturidade, alterações morfológicas da sua estrutura celular ou produção aumentada de determinado tipo de leucócito, menos frequente [17].

É possível a ocorrência de neoplasias malignas em cada estágio da sequência de amadurecimento das células sanguíneas. Normalmente, quanto mais inicial o estágio da célula afetada, mais grave é o prognóstico. O termo leucemia refere-se a uma neoplasia maligna dos leucócitos, embora a sua definição se estenda frequentemente para incluir neoplasias malignas de qualquer tipo de célula precursora de outras linhagens sanguíneas. Na maioria dos casos, o número total de leucócitos circulantes está aumentado. A leucemia aguda, quando não tratada tem uma sobrevida inferior à da leucemia crônica não tratada, sendo que a célula predominante é o blasto. Na maioria dos casos aparecem mais de 30% de blastos no sangue periférico. Na leucemia crônica as células predominantes encontram-se num estágio mais maduro [8,17].

As leucemias são também classificadas de acordo com as suas características citológicas – mielóide e linfóide. A proliferação na leucemia mielóide aguda consiste predominantemente de mieloblastos, enquanto que na leucemia mielóide crônica consiste principalmente de células mais diferenciadas, como mielócitos, metamielócitos, neutrófilos e relativamente poucos mieloblastos. Na leucemia linfóide aguda, a proliferação é de linfoblastos, enquanto que na leucemia linfóide crônica ela é composta por linfócitos maduros pequenos [17].

Os mieloblastos e os linfoblastos são morfológicamente muito semelhantes nos esfregaços sanguíneos pelo que não é possível estabelecer uma diferenciação segura apenas com base no aspeto morfológico [9].

Os linfomas malignos assemelham-se, basicamente, as leucemias linfocíticas. Ambos derivam da série linfocítica, no entanto, as leucemias têm origem na medula óssea enquanto que os linfomas têm a sua origem fora da medula, normalmente nos nódulos linfáticos. Os linfomas pode ser doença de Hodgkin ou linfomas não Hodgkin, sendo que os não Hodgkin

ainda se podem classificar em linfomas de células B ou em linfomas de células T e NK. O diagnóstico dos linfomas é estabelecido por biópsia [17,18].

4.3. Estudo de hemoglobinopatias

Este estudo pode ser feito pelo doseamento das hemoglobinas A2 e F. O aparelho utilizado é o mesmo que no doseamento da HbA1c, no caso do Laboratório Labeto é o HA8180T Analyser. Esta técnica auxilia no diagnóstico da hemoglobinopatia, sendo que posteriormente deverão ser feitas outras técnicas até mesmo no sentido de proporcionar um aconselhamento genético, pois indivíduos portadores, muitos deles assintomáticos poderão ter filhos com sintomas mais severos, se o cônjuge for também portador [2].

A quantificação de Hemoglobina A2 é um meio diagnóstico de exclusão de talassémia. Um aumento da HbA2 num dado doente é um indicador característico de uma β -talassémia heterozigótica. A HbF conjuntamente com a HbA2 permite classificar o tipo de talassémia. Os resultados da Hemoglobina A2 e Hemoglobina F devem de ser observados em conjunto, e juntamente com outros dados auxiliam no diagnóstico de talassémia e hemoglobinopatias [21].

Quando observamos um resultado com uma percentagem superior a 3,8% de A2, podemos considerar que estamos perante uma β -talassémia. Em doentes com VGM inferior a 76 fl ou HGM inferior ou igual a 26 pg, e com valores borderline de HbA2 ou até mesmo baixos, deve ser verificada a existência de uma Anemia Ferropénica, a qual pode mascarar uma eventual talassémia [21].

Para determinar a HbA faz-se o seguinte cálculo:

$$\%HbA = 100 - (\%HbF + \%HbA2 + \%variantes \text{ se existirem})$$

As talassémias são um grupo heterogéneo de distúrbios genéticos da síntese de hemoglobina, resultando de uma ausência ou redução da síntese de uma das cadeias globínicas α ou β [21].

Tabela 4. Classificação de β -talassémias ($\beta 0$ (ausência de cadeias), $\beta+$ (redução da quantidade de cadeias)) [2].

Talassémia Minor	Heterozigótica, Anemia ligeira, hipocrômica e microcítica e Hb A2 elevada (>3,5%).
Talassémia Intermédia	Homozigotia ou dupla heterozigotia ($\beta+/\beta+$), Anemia hipocrômica e microcítica, HbA2>3,5% e HbF 10-60%.
Talassémia Major	Ausência de síntese de cadeias ($\beta 0/\beta 0$), Anemia severa, dependente de transfusões desde o 1 ^a ano de vida, não há HbA e HbF elevada.

Tabela 5. α -Talassemias (delecção dos genes da cadeia alfa) [21].

4 genes	Hidrops Fetalis
3 genes	Doença da hemoglobina
2 genes	VGM e HGM baixos

Caso haja pico na área da HbS tem de se fazer prova da solubilidade HbS (*Kit*) ou prova de falciformação. A prova de falciformação consiste na transformação de eritrócitos em drepanócitos na presença de uma diminuição da concentração de oxigénio. O grau e a rapidez do aparecimento destas formas vão depender da concentração da HbS. Esta variante da hemoglobina encontra-se na drepanocitose que é uma doença qualitativa resultante da alteração da estrutura da cadeia globínica (troca de ácido glutâmico por valina na 6^a posição), em que o eritrócito adquire a forma de foice. A HbS produz uma redução da oxigenação. O indivíduo heterozigótico (portador da mutação) é praticamente assintomático, enquanto o homozigótico apresenta uma anemia hemolítica crónica com gravidade variável que pode incluir vasooclusões, maior risco de acidente vascular cerebral, necrose da cabeça do fémur e úmero, úlceras nas pernas e infeções pulmonares [2,21].

5. Provas de avaliação da hemostase

A hemostase é a sequência de eventos fisiológicos que culmina com o término da hemorragia vascular. Depende do fluxo e vasos sanguíneos, sistema procoagulante, anticoagulantes naturais e sistema fibrinolítico [17].

O crescente número de indicações para anticoagulação, bem como o aumento do número de anticoagulantes terapêuticos disponibilizados, torna imperativa a compreensão dos testes de coagulação como forma de monitorização destes fármacos.

O Sistema Hemostático protege o sistema vascular e permite que, em caso de lesão, os tecidos sejam reparados e as suas funções restabelecidas [18].

Hemostase primária: Consiste na formação de um coágulo sanguíneo ou trombo plaquetar e tem por objetivo parar a hemorragia que ocorre quando a parede de um vaso é danificada. Este trombo consiste num aglomerado de plaquetas que se forma em torno do local da lesão [14,20].

Hemostase secundária: A coagulação sanguínea é um processo auto-catalítico e auto-limitado que culmina na formação de trombina em quantidades suficientes para a conversão do fibrinogénio em fibrina. Resulta da ativação sequencial dos fatores da coagulação que circulam no plasma na forma inativa (Figura 9) [14,20].

A cascata da coagulação pode ser ativada por duas vias: a **via Intrínseca/de contacto** e a **via Extrínseca/tecidual** convergindo depois para uma via comum. Esta separação só se verifica *in vitro*, uma vez que, na realidade as duas vias não são independentes uma da outra [14,20].

A **via comum** inicia-se com a ativação do fator X pelo fator IXa e pelo fator VIIIa provenientes da via intrínseca, e pelo fator VIIa da via extrínseca. Esta cascata culmina, então, na conversão de pró - trombina em trombina pelo fator Xa, na presença de cálcio, do fator Va e de fosfolípidos pró – coagulantes (Figura 9) [14,20].

Após a degradação do fibrinogénio pela trombina, libertam-se dois fibrinopeptídeos A e dois fibrinopeptídeos B, dando origem à fibrina solúvel [20].

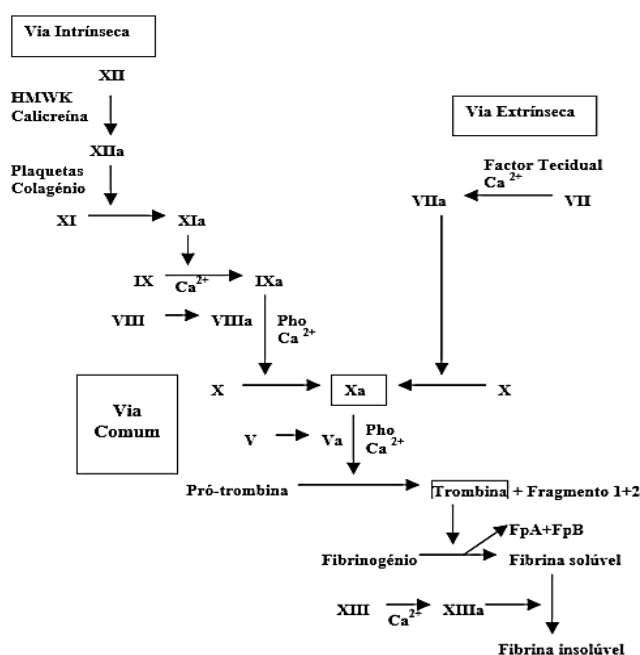


Figura 9. Cascata de coagulação [18].

A **fibrinólise** é o processo fisiológico pelo qual a fibrina é dissolvida. De modo análogo à coagulação, o sistema fibrinolítico plasmático é constituído por uma série de proteínas (ativadoras e inibidoras) produzidas essencialmente pelo fígado, endotélio vascular e plaquetas, nomeadamente a antitrombina, a proteína C, a proteína S etc. [14,20].

O aparelho utilizado para a realização das análises desta seção (coagulação) é o CS-5100 System. Este é um analisador automático que permite realizar testes de coagulação e de agregação. As análises efetuadas neste equipamento são TP, TTP, Antitrombina III e Fibrinogénio.

5.1. Tempo de protrombina (TP) e *International Normalized Ratio* (INR)

O tempo de protrombina avalia a via extrínseca/tecidual. Esta prova é utilizada como prova clássica de avaliação hemostática, de monitorização de terapêutica com anticoagulantes orais do tipo cumarínico e para avaliação da função hepática.

O plasma é incubado a 37°C e posteriormente é adicionado reagente (fator tecidual com lípidos e cálcio). A precisão do PT foi questionada, uma vez que existe uma grande variabilidade na sensibilidade dos reagentes de protrombina utilizados na sua determinação.

Por isso, é necessário corrigir o valor do TP, para ficar normalizado entre laboratórios, independentemente dos reagentes e aparelhos usados, sendo calculado pela fórmula ***International Normalized Ratio (INR) = (TP doente / TP controlo)***^{ISI}. onde ISI significa Índice de sensibilidade internacional do reagente e o PT (controlo) é o valor de PT do controlo com 100% de atividade [19].

Os valores de INR para doentes sob medicação com anticoagulantes orais devem situar-se entre 2 e 3. Abaixo do valor mínimo há a possibilidade de ocorrer a formação de trombos mais facilmente e acima do valor máximo há o risco de hemorragia. Para indivíduos saudáveis os valores de INR situam-se entre 0,9 e 1,2 [8].

O valor do INR aumenta em casos de défice dos fatores I, II, V, VII e X, deficiência de vitamina K, terapêutica com anticoagulantes ou com heparina em doses elevadas, doença hepática grave, etc. O INR pode estar diminuído em estados pró-trombóticos (como nos períodos pós-parto ou pós-cirúrgico) [18].

5.2. aPTT: Tempo de tromboplastina parcial ativada

O Tempo de tromboplastina parcial ativada é uma prova que avalia a via intrínseca ou de contacto. O reagente utilizado é a cefalina caulino que é adicionado ao plasma e a mistura é incubada, posteriormente é adicionado o Ca²⁺ de forma a desencadear a cascata da

coagulação e regista-se o tempo que o plasma demora a coagular. O tempo de referência varia entre 30 a 40 segundos [17].

O aPTT pode estar prolongado em situações como deficiência dos fatores I, II, V, VIII, IX, X, XI, XII, pré-caliceína e cicinegénio de alto peso molecular (HMWK), doença hepática, coagulação intravascular disseminada e transfusões sanguíneas, terapêutica com heparina, anticoagulantes orais (doses altas) e trombolíticos. O aPTT pode estar diminuído em qualquer estado de hipercoagulabilidade [18].

5.3. Fibrinogénio e Antitrombina III

A enzima trombina converte a proteína plasmática solúvel fibrinogénio no seu polímero insolúvel fibrina. Em altas concentrações de fibrina e baixas concentrações de fibrinogénio, a taxa de reação é determinada pela concentração de fibrinogénio [18].

O doseamento do fibrinogénio é um doseamento cronométrico. Baseia-se no facto de quando um plasma diluído é colocado em presença de um excesso de trombina, o logaritmo de tempo de coagulação está em relação linear com o logaritmo da concentração de fibrinogénio no plasma em estudo. Mede-se, então, o tempo de coagulação do plasma diluído após adição de trombina. O tempo de coagulação assim medido é então comparado com o de um preparado de fibrinogénio standardizado. O tempo de coagulação depende da quantidade de fibrinogénio na amostra, sendo inversamente proporcional [18].

Os valores normais no adulto são de 2-4 g/l e na criança 1,5 – 3 g/l [17].

A antitrombina é um inibidor das serina-proteases que se liga a trombina e aos fatores Xa, IXa, XIa e XIIa, neutralizando a sua atividade. A capacidade da antitrombina em neutralizar a atividade da trombina é rapidamente potencializada pela presença de heparina. Deficiências hereditárias de antitrombina tornam os utentes propensos ao tromboembolismo venoso [18].

6. Imuno-hematologia

Para evitar possíveis reações imunológicas, por exemplo, numa transfusão sanguínea, o sangue deve ser convenientemente caracterizado. Para tal, procede-se à realização de testes como a determinação dos grupos sanguíneos, pesquisa de auto-anticorpos.

6.1. Grupo Sanguíneo

A determinação do grupo sanguíneo consiste em verificar a presença ou ausência dos antígenos A, B e Rhesus (Rh) na superfície dos eritrócitos.

O Sistema de grupo sanguíneo AB0 é um dos parâmetros de maior importância dentro da Imuno-hematologia, tendo implicações a nível de transfusões e de transplantação. Os antígenos AB0 são expressos a nível da membrana eritrocitária, endotelial e epitelial, desempenhando um papel muito importante como antígenos de histocompatibilidade [22].

A determinação dos grupos sanguíneos AB0 e Rh tem por base, pois, a reação de aglutinação. Esta prova é altamente específica e bastante sensível, sendo um valioso instrumento de pesquisa e um meio útil de diagnóstico. Em caso de transfusões sanguíneas, os antígenos do grupo AB0 são bastante importantes. O sucesso de uma transfusão sanguínea depende pois, da compatibilidade entre o sangue do dador e o sangue do recetor [23].

O fenómeno de aglutinação dividiu a população em quatro grupos que se chamou de A, B, 0 e AB. Os epítomos antigénicos são determinados por carboidratos ligados a polipéptidos ou lípidos, formando respetivamente glicoproteínas ou glicolípidos. A cada antígeno corresponde uma iso-aglutinina (Anti-A ou Anti-B), a qual esta ausente num soro de um sujeito com o respetivo antígeno sobre os eritrócitos [22].

O antígeno D (Sistema Rh) é extremamente imunogénico, uma vez que leva à produção de anti-D na maior parte dos indivíduos Rh- (não possuem o antígeno D), sendo este produzido por exposição ao antígeno D em resultado de uma transfusão ou gravidez. Quando uma grávida Rh- dá à luz um filho Rh+, a mãe vai produzir anticorpos anti-D. Diz-se que é uma grávida imunizada. Caso ocorra uma segunda gravidez e o feto seja Rh+, os anticorpos sensibilizados da mãe vão atravessar a placenta e hemolisam os eritrócitos do feto. Atualmente, este problema encontra-se ultrapassado uma vez que se administra à mãe, uma imunoglobulina anti-D [22,23].

A técnica utilizada para a determinação do grupo AB0 e Rh é a técnica em gel.

Os cartões de gel, permitem determinar o grupo sanguíneo de uma amostra de sangue, por prova direta AB0 e determinação de antígenos RHI (D). Em cada um dos cartões de gel existem seis micro tubos, contendo cada um deles um reagente específico do antígeno eritrocitário em teste. Um dos seis micro tubos é apenas utilizado como sinal de controlo, indicando se o cartão em uso se encontra dentro dos parâmetros esperados de funcionamento para um teste válido. Após centrifugação, os glóbulos vermelhos não aglutinados, isto é, os que não reagiram ao reagente do micro tubo, concentram-se no fundo do micro tubo. Por outro lado, os glóbulos vermelhos aglutinados ficam suspensos no gel, sendo a sua altura o indicador da intensidade da reação. Para leitura e interpretação visual dos resultados, considera-se então que o resultado do micro tubo é positivo se a suspensão de glóbulos vermelhos não se encontrar totalmente concentrada no fundo do micro tubo.

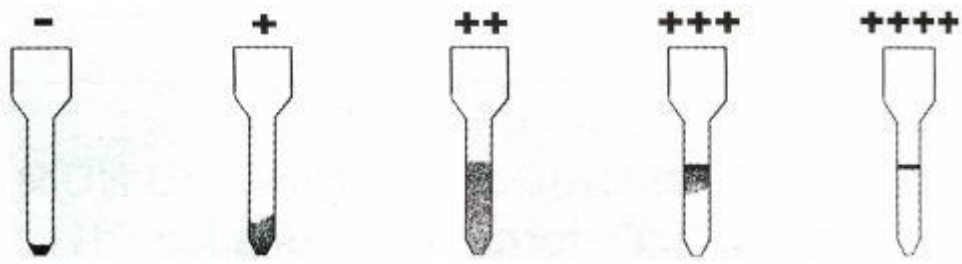


Figura 10. Resultados em diferentes intensidades de reação.

Tabela 6. Grupo sanguíneo sistema AB0

Grupo Sanguíneo	Anti-A	Anti-B	Anti-AB
A	+	-	+
B	-	+	+
AB	+	+	+
0	-	-	-

Tabela 7. Grupo sanguíneo sistema Rh

RhD Positivo	RhD Negativo
+	-



Figura 11. Card com determinação do Grupo Sanguíneo (ex.: B+)

6.2. Testes de Antiglobulina Direto e Indireto

Este teste, apesar de não ser realizado na secção de hematologia parece-me importante a sua referência nesta área.

O teste de antiglobulina (Coombs) é um dos principais testes serológicos imuno-hematológicos para detetar os anticorpos capazes de se ligar ao seu antígeno homólogo eritrocitário, mas não produzem aglutinação [21].

Os anticorpos “fixos” sobre os eritrócitos são detetados com ajuda de um soro com antiglobulinas humanas (AGH) que reduzem o Zeta Potencial até ao ponto crítico, promovendo, assim, aglutinação, ou seja, este reagirá com os anticorpos à superfície dos eritrócitos sensibilizadas provocando a aglutinação entre eles. O TAD (teste de antiglobulina direto) tem

como objetivo detetar se os eritrócitos estão revestidos *in vivo* com imunoglobulina e/ou complemento. O TAI (teste de antiglobulina indireto) tem como objetivo a pesquisa no soro de anticorpos incompletos [24].

A técnica utilizada é a técnica em gel (*cards*) que contém antiglobulina humana (AGH) poliespecífica. A função mais importante do reagente de AGH poliespecífica consiste em detetar a presença de IgG. A importância do anti-complemento no reagente AGH é discutível, visto que os anticorpos que apenas são detetáveis pela sua capacidade de se unirem ao complemento são bastante raros. No entanto, a atividade de anti-C3d é importante para o TAD na investigação de anemias hemolíticas autoimunes [23].

Tabela 8. Aplicações TAD e TAI na prática clínica [23].

TAD	TAI
Doença Hemolítica Perinatal	Pesquisa e identificação de anticorpos irregulares
Anemia Hemolítica Autoimune	Provas de Compatibilidade Pré-Transfusionais
Hemólise induzida por drogas	Imunização feto-maternal
Reações Hemolíticas Pós-Transfusionais	Imunização pós-transfusional

7. Controlo de qualidade – Hematologia

O Laboratório Labeto participa no Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade do INSA em Hematologia, recebendo periodicamente, amostras identificadas, acompanhadas de alguma informação clínica, para que nas datas pré-estabelecidas sejam efetuadas as contagens celulares, análise da morfologia de sangue periférico com provável hipótese diagnóstica, ou outras determinações indicadas, de acordo com a metodologia de rotina do laboratório e enviados os resultados. O Laboratório Labeto participa também no programa NEQAS, no qual são efetuadas contagens diferenciais manuais, análise da morfologia do sangue periférico e provável hipótese diagnóstica. Através do programa NEQAS, são ainda recebidas amostras para se identificar parasitas no sangue periférico.

O objetivo destes ensaios inter-laboratoriais é o de assegurar a comparabilidade e uniformidade dos resultados dos laboratórios clínicos. A participação em programas de avaliação externa da qualidade constitui, para os laboratórios uma forma de deteção de erros sistemáticos, através da comparação dos seus resultados com os de outros laboratórios.

Para além deste controlo externo da qualidade, é realizado diariamente um controlo interno. No aparelho Sysmex, são utilizados três controlos, de três níveis diferentes, um baixo, um normal e um alto, sendo que, cada dia é testado um nível. Na coagulação, para cada técnica são testados dois controlos, de dois níveis diferentes, um normal e um patológico, diariamente.

Este controlo de qualidade interno destina-se, fundamentalmente ao controlo da reprodutibilidade dos métodos e resultados, vigiando a incidência de erros fortuitos.

8. Caso Clínico

Homem de 21 anos, sem dados clínicos na sua ficha clínica, revelou no hemograma um baixo número de GV e uma anemia (Hb de 103 g/L) classificada como hipocrómica e normocítica (HCM de 26,1 pg e VCM de 26,1 pg).

Numa primeira análise podíamos suspeitar de uma anemia sideropénica uma vez que o RDW está também bastante aumentado (18,5%, característico a estas situações). Observou-se também um elevado grau de anisocitose e a contagem de plaquetas foi indicou trombocitose ($476 \times 10^9/L$) (Tabela 9).

Tabela 9. Resultados do hemograma de um homem de 21 anos obtidos após análise no equipamento XN-1000.

GV	3,95 X 10 ¹² /L	WBC	10,3 X 10 ⁹ /L
Hb	103 g/L	NEU	6,50 X 10 ⁹ /L
Ht	0,317 L/L	LYN	2,90 X 10 ⁹ /L
VCM	80,3 fl	MONO	0,70 X 10 ⁹ /L
HCM	26,1 pg	EOS	0,20 X 10 ⁹ /L
CHCM	324 g/L	BASO	0 X 10 ⁹ /L
RDW	18,5%		
		PLT	476 X 10 ⁹ /L

Tendo em conta este quadro de anemia e trombocitose, após repetição do hemograma, confirmaram-se os resultados no ESP (Figura 12).

No ESP foi possível confirmar a anemia pela presença de glóbulos vermelhos com hipocromia. Foram, ainda, encontradas “*Target cells*” (Figura 12). A trombocitose foi também confirmada pelo elevado número de plaquetas presentes por campo.

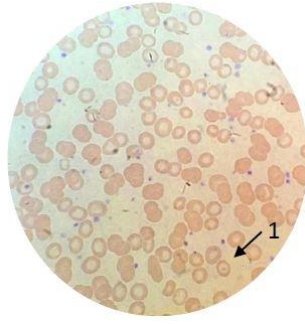


Figura 12. Observação ao microscópio ótico de esfregaço de sangue periférico de um homem de 21 anos após Coloração May-Grünwald-Giemsa. Confirmou-se a anemia hipocrômica e normocítica e a trombocitose com presença de anisocitose eritrocitária. Destaca-se a observação de uma Target cell (1).

9. Microbiologia

A área da Microbiologia é uma área extremamente abrangente, interessante e em constante evolução, pelo que desde logo escolhi esta valência para aprofundar no presente relatório. Ao setor da Microbiologia do Labeto chegam vários tipos de produtos biológicos (urina, fezes, exsudados, expetoração, etc.) para proceder à respetiva análise. Este setor é isolado das restantes áreas, com equipamento próprio, nomeadamente estufa de incubação com estudo de verificação de temperatura, dispositivos para obtenção de atmosfera pobre em oxigénio, bico de Bunsen, microscópio ótico, câmara de fluxo laminar, etc. As técnicas utilizadas para o diagnóstico etiológico das infeções dependem, em grande medida, das características bioquímicas dos microrganismos que se pretendem identificar. Desta forma, o diagnóstico das infeções bacterianas é efetuado mediante exame microscópico e cultural da amostra biológica. Estes procedimentos permitem isolar as espécies bacterianas que estão a causar infeção para depois serem identificadas e estudada a sua sensibilidade a antibióticos. Para se efetuar o estudo microbiológico adequado é fundamental a realização de uma colheita, transporte e conservação adequados [25].

De notar que muitos dos procedimentos que vão ser mencionados são baseados nos Procedimentos Específicos do Laboratório, que constam no Manual de Qualidade do mesmo.

9.1. Colorações usadas em Microbiologia

As colorações usadas na Microbiologia são a coloração de Gram (que permite diferenciar entre bactérias Gram positivas e Gram negativas, devido às diferentes características da sua parede celular, assim como a sua estrutura) e a coloração de Ziehl-Neelsen (para bacilos ácido-álcool resistentes, como é o caso das Micobactérias). No laboratório é usado um equipamento, o Mirastainer II(*), que faz estas colorações automaticamente. Este aparelho tem vários poços onde são colocados os corantes correspondentes a cada coloração e um braço mecânico onde são colocadas as lâminas com o inóculo. O técnico da secção prepara as lâminas, insere-as num suporte do braço mecânico e coloca este no braço. De seguida, adiciona os poços com os corantes da coloração pretendida e seleciona o programa do aparelho que faz esta coloração (o aparelho foi pré-programado para as diferentes colorações pelo que ao selecionar o programa pretendido, este assume os tempos necessários que as lâminas têm de ficar em cada corante).

(*). Este aparelho foi descontinuado pelo fornecedor, pelo que não existem atualmente artigos publicados acerca do funcionamento do mesmo, apenas o manual de funcionamento do equipamento, que acompanha o mesmo.

9.2. Meios de cultura

Gelose Hecktoen: É um meio sólido seletivo, uma vez que inibe o crescimento da microbiota normal do intestino, permitindo o crescimento de *Salmonella sp.* e *Shigella sp.* É composto por sais biliares (inibidores), 3 açúcares (lactose, salicina e sacarose), um indicador de pH (fucsina ácida e azul de bromotimol) e citrato férrico amoniacal juntamente com tiosulfato sódico, que forma um centro negro em bactérias produtoras de H₂S. *Shigella sp.* apresenta-se incolor sem centro negro e a *Salmonella sp.* incolor com centro negro, permitindo a sua distinção [26].

Caldo Tetrionato: É um caldo de enriquecimento seletivo de *Salmonella sp.*, uma vez que contém sais biliares e tiosulfato de sódio que inibem o crescimento de outras bactérias da microbiota intestinal, apenas permitindo que as bactérias redutoras de tetrionato se 28 multipliquem. Para inibir o crescimento de *Proteus spp.* (que também reduz o tetrionato) são adicionados 100uL de iodo e 25uL de novobiocina (antibiótico) a este caldo [27, 28].

Gelose MacConkey: Este meio contém cristal violeta e sais biliares, o que permite que seja um meio seletivo de isolamento e diferenciação para bactérias Gram negativo. A fermentação da lactose pelas bactérias leva à formação de colónias vermelhas com precipitado à volta (halo de sais biliares) pela viragem do vermelho neutro (indicador de pH). As estirpes não fermentadoras de lactose dão colónias incolores ou beges.

Gelose Manitol Salt Agar (MSA): Este meio é seletivo para *Staphylococcus spp.* (fermentador do manitol). Este meio contém peptonas, cloreto de sódio a 7.5%, que inibe o crescimento de outras espécies não halófilas, vermelho de fenol como indicador de pH. Este meio permite ainda a diferenciação de *Staphylococcus* em coagulase positivo (colónias amarelas) e coagulase negativas (colónias vermelhas, pois não alteram a cor do vermelho de fenol) [29].

Gelose Chocolate: usamos a Gelose Chocolate Agar PolyVitex VCAT e a Gelose Haemophilus Chocolate da *Biomerieux*, que contém hemina (fator X) e dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD – fator V), além de alguns antibióticos e antifúngicos. Estas geloses diferem no tipo de antibióticos que contém: a primeira é composta por vancomicina, colistina, anfotericina e trimetoprim, permitindo o isolamento de *Neisseria gonorrhoeae* e *N. meningitidis*, a segunda contém bacitracina, inibindo o crescimento de bactérias Gram positivas e a maioria das espécies de *Neisseria*.

Gelose Sangue: usamos o meio COS da *Biomerieux*, que é um meio muito nutritivo e que facilita o crescimento de bactérias exigentes, como é o caso de *Streptococcus sp.*, devido ao seu conteúdo em peptonas. A sua composição com 5% de sangue de carneiro permite

identificar o tipo de hemólise dos microrganismos: a α -hemólise corresponde a uma hemólise incompleta, aparecendo uma cor esverdeada em redor da colónia (ex: *Streptococcus pneumoniae*), a β -hemólise corresponde a uma hemólise completa, o que significa o aparecimento de uma zona transparente à volta da colónia (ex: *Streptococcus pyogenes*) ou γ -hemólise, que significa ausência de hemólise.

Gelose *Candida*: fornecida pela *Biomerieux*, este é um meio de isolamento de leveduras, devido ao substrato cromogéneo de hexosaminidase que sofre hidrólise na presença do seu indutor (presente em leveduras), resultando em colónias azuis de *Candida albicans*. Este meio contém ainda outros substratos que quando hidrolisados originam colónias rosa, típicas de *C. Tropicalis*.

Gelose *Sabouraud*: é um meio sólido que favorece o crescimento de algumas espécies de fungos, devido ao seu conteúdo em peptonas, glicose e pH ajustado a aproximadamente 5,6. A este meio pode ser adicionado cloranfenicol (antibiótico que inibe a maioria das bactérias) e actidiona (inibe fungos contaminantes como *Penicillium spp.*).

Gelose de *Mueller-Hinton*: esta gelose contém 5% de sangue (de carneiro, cavalo ou outro) e é fornecida pela *Biomerieux*, sendo usada nos testes de sensibilidade aos antibióticos por difusão manual para *Pneumococcus spp.* e *Streptococcus spp.*, que necessitam de sangue de carneiro para crescer.

Caldo *Todd-Hewitt*: fornecido pela *Biomerieux*, este é um caldo com antibióticos que se torna um meio seletivo para *Streptococcus* do grupo A de Lancefield (típicos de exsudados faríngeos) e B (típicos de exsudados vaginais em mulheres grávidas), assim como de *Staphylococcus aureus* e *S. aureus* metilina resistente (MRSA). São os antibióticos utilizados (ácido nalidíxico e colistina) que dão esta seletividade ao meio, inibindo o crescimento de bactérias Gram negativas.

Meio chromID[®] CPS[®] Elite (CPSE): fornecido pela *Biomerieux*, este é um meio diferencial usado para isolar bactérias provenientes de amostras urinárias, devido à sua composição em 2 substratos cromogéneos (β -glucuronidase e β -galactosidase), um que permite revelar a atividade enzimática bacteriana e outro que se baseia na revelação do indol pelo triptofano.

Meio chromID[®] Strepto B (STREPB): fornecido pela *Biomerieux*, este é um meio seletivo e cromogéneo para *Streptococcus* do grupo B (ex: *Streptococcus agalactiae*), onde estes crescem como colónias vermelhas.

Meio Löwenstein-Jensen: fornecido pela *Biomerieux*, este meio favorece o crescimento de micobactérias devido ao seu conteúdo em ovo, asparagina e fécula, fazendo com que as colónias de *Mycobacterium tuberculosis* tenham um aspeto típico tipo couve-flor. Sendo que esta bactéria se encontra geralmente em amostras de expetoração, antes de se proceder à sementeira desta, é necessário fluidificar e descontaminar a mesma, de forma a eliminar a microbiota comensal, favorecendo o crescimento das Micobactérias.

9.3. Amostras analisadas

9.3.1. Urina

As infeções do aparelho urinário são uma das infeções mais comuns no Homem, não sendo por isso de estranhar que o volume diário de amostras de urina que chega ao laboratório seja tão significativo. As bactérias da microbiota intestinal, podem ser: *Enterobacteriaceae* (ex: *Proteus*, *Klebsiella*, *Escherichia coli*), *Enterococcus sp.* ou *Staphylococcus aureus*, sendo as principais responsáveis por estas infeções, devido à sua facilidade em invadir o aparelho urinário através da uretra [30].

As mulheres estão naturalmente mais predispostas a este tipo de infeção, devido à anatomia do seu trato urinário. Aquando da invasão destas bactérias pela uretra, estas podem infetar a bexiga causando cistite ou podem subir até ao trato urinário superior, como é o caso dos rins, causando pielonefrite, uma infeção bastante mais grave. A urina é um fluido estéril, no entanto, ao passar através da uretra durante a micção pode arrastar alguns microrganismos presentes, dificultando um possível diagnóstico de infeção. Uma vez que a colheita desta amostra é habitualmente feita pelo próprio utente, é fundamental que este siga os princípios de colheita estabelecidos, disponibilizados em papel de forma simples e que informam que este deve fazer uma higiene com água e sabão da zona genito-urinária e de seguida colher o jato intermédio da primeira urina da manhã (rejeitar o jato inicial) para um recipiente esterilizado. Caso não seja possível ou o procedimento não tenha sido respeitado, o utente deve aguardar pelo menos 2h sem urinar até fazer nova colheita. [30] Após a colheita da urina, esta deve ser transportada até ao laboratório o mais rápido possível e deverá ser semeada até uma hora após a colheita (no caso de se tratar de uma urocultura). Sempre que isso não for possível, a mesma deve ser refrigerada a 4°C e semeada em meio CPSE até 24h após a colheita [30]. O passo seguinte é a análise da urina, onde se incluem a urina tipo II ou análise sumária de urina e a urocultura. A urina tipo II consiste em 2 etapas: a análise semi-quantitativa de alguns parâmetros bioquímicos: cor, leucócitos, nitritos, urobilinogénio, proteínas, pH, hemoglobina, cetonas, bilirrubina, glicose e o sedimento urinário (estimativa semi-quantitativa do número de

elementos figurados presentes nas amostras, como por exemplo: leucócitos, eritrócitos, células de descamação, etc.) [31].

9.3.2. Urocultura

A urocultura ou urina assética consiste na pesquisa de bactérias uropatogénicas em número representativo de infeção urinária. Nas amostras para urocultura é primeiro feita a análise sumária de urina para auxiliar o diagnóstico, nomeadamente através da presença de nitritos e leucócitos. O primeiro passo consiste na identificação das caixas de Petri, que contém o meio de cultura chromID® CPS® Elite da *Biomerieux*, com o código da amostra a semear, como se pode observar na Figura 13.



Figura 13. Urocultura em meio CPSE

Deste modo, a identificação presuntiva das bactérias é facilitada, devido às diferentes cores que estas apresentam no meio, de acordo com as suas características. De seguida, é inoculada a amostra com uma ansa de plástico esterilizada de 10 μ L, fazendo uma estria vertical central, e sem inocular novamente a ansa, espalhar a amostra fazendo estrias apertadas horizontais até ao fim da caixa, de modo a obter colónias isoladas. Rejeita-se sempre a ansa entre amostras para evitar contaminações. Por fim, guardam-se as caixas num suporte adequado e estas vão a incubar durante 18 a 24h a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$, para permitir o crescimento bacteriano. Na manhã seguinte são lidas as placas semeadas para ver se houve crescimento bacteriano de acordo com o esquema indicado na Figura 14.

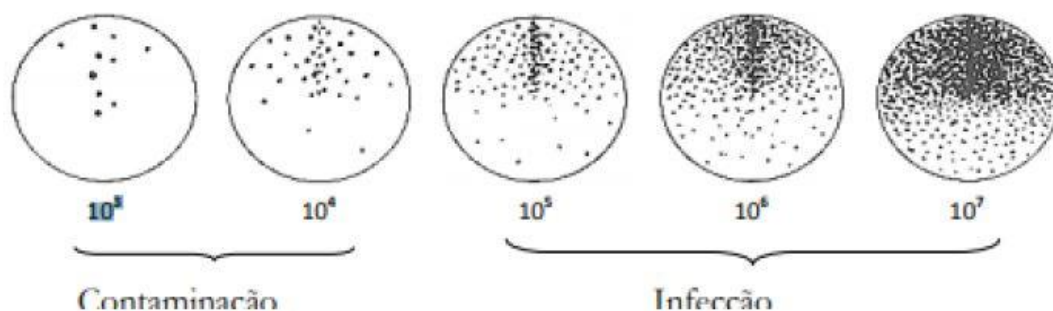


Figura 14. Quantificação de UFC em uroculturas

Se o número de unidades formadoras de colónias (UFC) for inferior a 10^4 ou existirem 3 ou mais bactérias presentes considera-se contaminação, no caso do sedimento ser negativo. Se o sedimento for positivo (leucócitos e/ou eritrócitos >30 por campo), faz-se a coloração de Gram e de Ziehl-Neelsen. Quando a cultura é negativa ($<10^4$), mas existem leucócitos e eritrócitos superiores a 15 confirma-se apenas com a coloração de Gram. Com colónias em número igual ou superior a 10^4 , tratando-se de uma cultura pura, considera-se infeção. Se a cultura não for pura, mas existir uma grande predominância de uma espécie bacteriana (número igual ou superior a 10^4), faz-se uma repicagem para novo meio e observa-se no dia seguinte. Nestes casos, o historial clínico do utente, como a presença de sintomas, a recorrência de ITU ou a toma de antibióticos nestes casos é muito importante para a tomada de decisão. Após a leitura das placas são então escolhidos os sedimentos urinários correspondentes às urinas que suscitam mais dúvidas. Estes são centrifugados durante 5 minutos a 2500rpm, é retirado o sobrenadante e o sedimento é espalhado sobre 1 ou 2 lâminas (consoante vão ser feitas ambas as colorações de Gram e Ziehl-Neelsen ou só Gram), para ser visto ao microscópio após coloração pelo Mirastainer II. Ao microscópio vamos procurar bactérias (quer sejam cocos, bacilos ou Micobactérias) ou leveduras em número significativo, para se poder considerar infeção. Finalmente, todas as placas que se consideraram positivas para infeção são guardadas para se fazerem testes complementares para identificação bacteriana e testes de suscetibilidade aos antibióticos no aparelho VITEK 2.

9.3.3. Fezes

A microbiota intestinal é das mais ricas existentes no ser humano, sendo única em cada pessoa. Esta é essencial na maturação do sistema imune, na proteção contra espécies patogénicas, na regulação endócrina e muitas outras funções, sendo por isso natural que as fezes não sejam uma amostra biológica estéril. No entanto, quando existe um desequilíbrio

nesta microbiota, o organismo fica vulnerável a espécies patogénicas, podendo causar infeções gastrointestinais, como diarreias, gastroenterites, cólera, colite hemorrágica [32].

A colheita das fezes para a coprocultura é feita pelo próprio utente ou por alguém responsável por este, quando este é dependente. O utente deve fazer a recolha das fezes para uma superfície lisa e limpa, usando a espátula que vem no recipiente fornecido pelo laboratório. A amostra recolhida não deve ultrapassar o tamanho de uma noz e deve ser refrigerada no recipiente estéril até ser entregue ao laboratório no próprio dia. O utente deve evitar zonas contaminadas pela urina e não usar papel higiénico na recolha, pois interfere com as análises a realizar.

Para a análise de pesquisa de sangue oculto nas fezes, a colheita deve ser feita para um kit específico que o laboratório disponibiliza aos utentes para esta análise. O utente não deve fazer a colheita se tiver hemorragias visíveis, hemorroidas, ou a menstruação, no caso de ser mulher, correndo o risco de obter falsos positivos.

9.3.4. Coprocultura

O exame bacteriológico ou coprocultura consiste na pesquisa de *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Campylobacter sp.* e *Staphylococcus aureus*. A pesquisa de *E. coli* enteropatogénica é feita no caso de se tratar de uma criança de idade igual ou inferior a 2 anos ou de diarreias aquosas. Se o médico suspeitar de outro microrganismo que não os indicados acima, deve solicitar uma análise para o agente(s) infeccioso(s) suspeito(s), para ser feito uma cultura em meio específico. O primeiro passo consiste num exame microscópico com coloração de Gram para avaliar o conteúdo em bactérias Gram positivas e Gram negativas e também em leveduras. De seguida, com uma parte da amostra de fezes, é feita uma suspensão num tubo com soro fisiológico e homogeneiza-se. A partir da suspensão, semeia-se nos meios *Hecktoen*, meio de enriquecimento de Tetracionato, em MSA (se o pedido do médico incluir pesquisa de *Staphylococcus aureus* ou se as fezes forem diarreicas) e em meio durante 18-48h.

Em crianças de idade inferior a 2 anos semeia-se também em meio *MacConkey*, para pesquisa de bacilos Gram negativos. No segundo dia faz-se a leitura dos meios. Se aparecerem colónias suspeitas de *Salmonella sp.* ou *Shigella sp.* no *Hecktoen* estas são repicadas para uma gelose nutritiva, permitindo o crescimento destes microrganismos ou para meio específico para *Salmonella sp.*, que é usado quando se suspeita de colónias de *Salmonella sp.* no *Hecktoen*, durante 24h a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, sendo depois novamente repicado para *Hecktoen*.

Neste meio de *Hecktoen*, as colónias de *Salmonella sp.* aparecem incolores com um centro negro (devido à formação de ácido sulfídrico, que faz precipitar iões ferro a partir dos

substratos de citrato férrico amoniacal e tiosulfato de sódio) e as colónias de *Shigella sp.* são incolores e sem centro negro, podendo, no entanto, algumas estirpes de *Salmonella sp.* também ter este aspeto. No terceiro dia faz-se a leitura das placas que foram repicadas e a partir das placas de *Nutrient Agar* fazem-se reações de aglutinação para *Salmonella sp.*, *Shigella sp.* e *E. coli* enteropatogénica.

Se estas reações derem positivas, procede-se à identificação das bactérias e respetivo antibiograma no VITEK 2, a partir do meio nutritivo que serviu para o isolamento de colónia. No caso de se suspeitar de *E. coli* produtora de Shiga toxina (STEC) não deve ser feito o antibiograma, uma vez que alguns antibióticos têm como alvo a parede bacteriana, provocando a sua destruição, o que leva à libertação da toxina e ao agravamento da situação clínica [33].

A pesquisa de *Campylobacter sp.* nas fezes é feita no Labeto usando um kit que deteta a presença do antigénio de *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*), através de um imunoensaio cromatográfico (RIDA® QUICK *Campylobacter* da Balea). Este kit contém uma membrana com duas bandas: a banda teste e a banda controlo. A primeira encontra-se revestida com anticorpos monoclonais anti-*C. jejuni*, que estão ligados a um corante vermelho. Na banda controlo estão Acs anti-IgG humana ligados também a um corante. Se a amostra contiver Acs de *C. jejuni*, estes vão migrar ao longo da membrana e ligar-se aos Acs da região teste, formando uma linha vermelha nessa região. Por ação capilar, a amostra vai continuar a migrar e todos os Acs ligados e não ligados vão reagir com os Acs anti-IgG da tira de controlo, onde aparece uma linha vermelha. A linha controlo vermelha indica que a realização do teste foi válida [34].

9.3.5. Exame parasitológico

Este exame consiste na observação a fresco de fezes concentradas para pesquisa de formas parasitárias, quer sejam ovos, larvas ou quistos. É recomendável que o exame seja feito em 3 amostras de fezes colhidas em dias diferentes, uma vez que a libertação de estruturas parasitárias não é contínua. No laboratório usamos um dispositivo com 3 secções diferentes, que permite que todo o processamento da amostra seja realizado num ambiente fechado, com a ajuda de formalina que estabiliza os parasitas e os separa dos restos de comida existentes.

O dispositivo contém uma espátula, que permite a recolha da amostra, um sistema de filtração que separa as fezes dos parasitas e um tubo de centrifugação, onde é colocada a espátula com a amostra. Este vai a agitar no vórtex durante um minuto e aguarda-se dez minutos antes de centrifugar durante dois minutos a 1000rpm. De seguida retira-se o sobrenadante e observa-se o que se depositou ao microscópio, sendo que os parasitas e as suas estruturas são identificadas por comparação com um atlas.

Os parasitas que se encontram com mais frequência são os quistos de *Giardia lamblia*, quistos de *Entamoeba coli* e *Entamoeba hartmanni*, ovos de *Enterobius vermicularis* e ovos de *Ascaris lumbricoides*.

9.4. Exsudados

No laboratório são analisados diversos exsudados, sendo que a sua colheita é feita por um técnico, enfermeiro ou pelo próprio médico, sob as condições necessárias.

9.4.1. Pesquisa de *Streptococcus* do grupo B

A pesquisa de *Streptococcus* do grupo B (apresentam uma β -hemólise) é feita em mulheres grávidas, entre as 34 e 37 semanas de gestação. Esta pesquisa é feita, uma vez que estas bactérias podem colonizar as regiões genital e retal da mulher, não lhe causando qualquer problema, mas com elevado risco de infeções neonatais, devido ao contacto com estas bactérias durante o parto [35].

Assim, esta análise é realizada usando 2 zaragatoas, uma para a região vaginal e a outra para a região anal, e colocadas em meio de transporte, sendo que a mulher não deve fazer a higiene da região no dia da colheita, de forma a não causar falsos negativos. Ambas as zaragatoas são semeadas em meio líquido *Todd-Hewitt* durante 24h e são depois repicadas para o meio STRB, durante 48h. Se houver crescimento neste meio, as colónias suspeitas apresentam uma coloração vermelha, no entanto, para identificar com certeza que se trata de *Streptococcus* do grupo B, é feito um teste confirmatório, usando o kit PASTOREX™ STREP da BIO-RAD, que pesquisa o antigénio específico do grupo através de um antissoro que contém o anticorpo correspondente coberto por partículas de látex. Esta reação necessita de uma enzima de extração incubada durante 10 minutos a 37°C com uma diluição da bactéria para que o antigénio fique livre para a reação com o antissoro. Quando a reação é positiva observa-se aglutinação e é feita a identificação definitiva.

9.4.2. Exsudado vaginal

A colheita do exsudado vaginal deve obedecer a alguns princípios tais como a utente não estar menstruada, não ter relações sexuais nas 24h anteriores à colheita e não ter tomado antibiótico ou antimicótico nos 5 dias anteriores, e não fazendo a higiene no dia da colheita.

O técnico responsável por fazer a colheita deve também ter em atenção se a utente está grávida, se é uma criança ou uma utente que ainda não iniciou a atividade sexual, e nestes casos não deve usar o espéculo. Para a colheita é necessário a recolha de duas zaragatoas

distintas, sendo que cada zaragatoa é introduzida até ao colo do útero. Uma das zaragatoas é seca e serve para fazer 2 lâminas (coloração de Gram e azul de metileno), para medir o pH e à qual se adiciona uma gota de soro fisiológico, para a manter hidratada quando for mantida na estufa a 37°C, para posterior exame direto para pesquisa de *Trichomonas vaginalis*. A outra zaragatoa é colocada em meio de transporte de carvão e será usada para semear a amostra nas Geloses de sangue (COS), Chocolate, MSA e Gelose *Candida*.

Quando é pedida a pesquisa de *Mycoplasma hominis/Ureaplasma spp.* ou *Chlamydia sp.*, é necessário fazer a raspagem do colo do útero, recolhendo o maior número de células possível, e a zaragatoa usada é colocada num tubo com um meio de transporte específico. No caso da pesquisa do ADN de *Chlamydia sp.* é usada uma zaragatoa seca específica. O primeiro passo a fazer é o exame direto em lâmina para observar a presença de células epiteliais, leucócitos, bactérias, leveduras e o parasita *Trichomonas vaginalis*. De seguida é feita a observação dos esfregaços com coloração de Gram (ver Figura 15, que orienta a identificação bacteriana nos diversos produtos biológicos) e azul de metileno.

A sementeira nos meios acima referidos orienta para a pesquisa de *Neisseria gonorrhoeae* (colónias transparentes em gelose de Chocolate; diplococos Gram negativo dentro e fora de leucócitos observados na coloração de Gram), *Streptococcus* do grupo B (nas grávidas), *Candida spp.* (*C. albicans* aparece com colónias azuis em gelose *Candida*) e *Staphylococcus* (*S. aureus* aparece com colónias amarelas em Gelose de Manitol, como se pode ver na Figura 15).

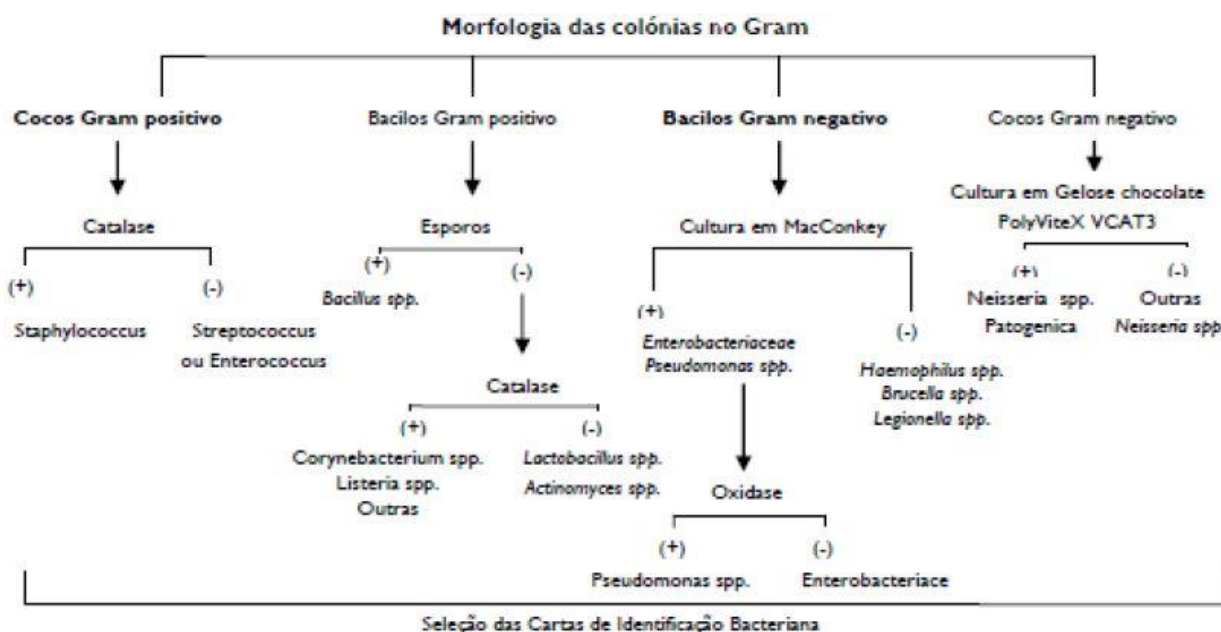


Figura 15. Esquema do procedimento para Identificação Bacteriana (Adaptado de [36]).

Para confirmar se o crescimento em gelose MSA se trata de *S. aureus*, após observação da lâmina corada por Gram, é feito o teste da catalase, para distinguir entre *Staphylococcus* sp. (catalase positivo) e *Streptococcus* sp. (catalase negativo). Este teste consiste em colocar 1 gota de H_2O_2 numa lâmina e adicionar uma colónia isolada da bactéria a testar, de modo a observar formação de bolhas de oxigénio. Se houver esta formação de bolhas, estamos perante *Staphylococcus* sp. e prosseguimos com os testes complementares de identificação, como é o caso do teste da coagulase. Este é feito através do kit PASTOREX™ STAPH-PLUS, deteta a presença desta enzima, que se encontra nas estirpes de *S. aureus*, através do uso de anticorpos, ligados a partículas de látex azul, dirigidos contra as estruturas desta bactéria. Na presença de *S. aureus* observa-se aglutinação com o reagente R1 e nenhuma aglutinação com o reagente R2 (que funciona como controlo negativo), como se pode observar na Figura 16.

A existência de bacilos Gram positivos é indicativo de bacilos de Döderlein ou lactobacilos, que são típicos da microbiota vaginal, produzindo ácido láctico que é essencial para manter o pH ácido da vagina. O diagnóstico de *Gardnerella vaginalis* é habitualmente feito pela observação de “clue-cells” no exame microscópico, por um pH > 4,5 e pelo teste da amina positivo (a adição de potassa cáustica KOH 10% à zaragatoa revela um odor característico a peixe podre). Quando este é positivo não é feito antibiograma, por não ser viável e a infeção é tratada empiricamente com metronidazol [37].

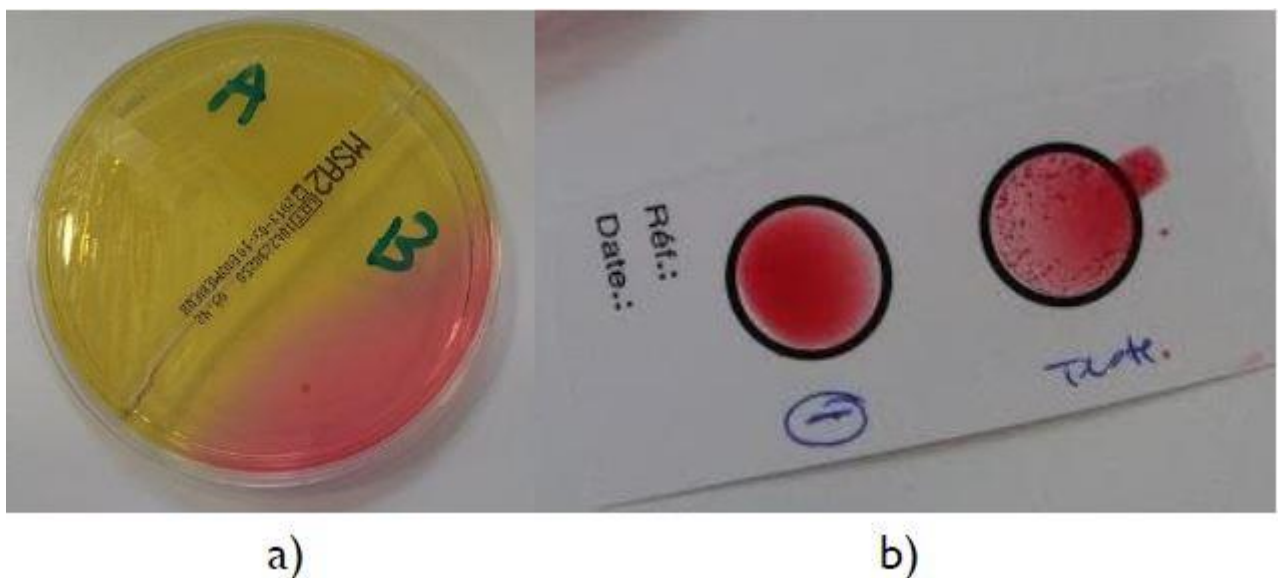


Figura 16. a) *S. aureus* em gelose MSA; b) Teste da coagulase positivo para *S. aureus*.

Quando é feita a leitura dos meios às 24h e 48h, de seguida é feita a identificação das colónias no Vitek2, recorrendo a cartas de identificação NH (*Neisseria/Haemophilus*), no caso de suspeita de *Neisseria gonorrhoeae*, sendo o respetivo antibiograma feito no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) por E-test.

Na suspeita de *Streptococcus* sp. e após o teste de aglutinação PASTOREX STREP positivo, é feita identificação definitiva e o antibiograma (ATB), recorrendo a cartas próprias no Vitek2.

Para o exame micológico é semeada uma gelose Sabouraud específica, onde *C. albicans* cresce em colónias azuladas, sendo que as restantes espécies de *Candida* sp. crescem com outras cores, pelo que são identificadas no Vitek2.

9.4.3. Exsudado uretral

Esta colheita deve ser efetuada preferencialmente antes da primeira micção do dia ou pelo menos 3h após a última micção, não podendo ser feita a higiene matinal desta zona e o utente não deve ter relações sexuais antes da colheita. A colheita desta amostra é maioritariamente feita a utentes do sexo masculino, onde o técnico de colheitas deve pressionar a uretra para colher a “gota matinal” com uma zaragatoa estéril, que será usada para fazer 2 lâminas para coloração de Gram e de azul de metileno, respetivamente. De seguida, tanto para utentes do sexo masculino como do sexo feminino, introduzem-se 2 zaragatoas finas e flexíveis na uretra, com um movimento rotativo, uma zaragatoa seca e a outra em meio de carvão. No caso de utentes do sexo feminino, a primeira zaragatoa é usada para fazer 2 lâminas como explicado anteriormente, assim como para fazer o exame direto (onde se coloca uma gota de soro fisiológico para não desidratar e se coloca na estufa a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ para pesquisa de *Trichomonas* sp. e para observação de células). A zaragatoa em meio de carvão é usada para a sementeira nos meios de cultura adequados: Gelose de sangue, Gelose MSA, Gelose *Candida*, Gelose de *MacConkey* e Gelose Chocolate, onde é feita a sua leitura após 24h e 48h ou 72h (no caso da Gelose MSA, Gelose *Candida* e Gelose Chocolate).

O procedimento para a identificação dos microrganismos é o seguinte: - Observação de diplococos Gram negativo sugestivos de *Neisseria gonorrhoeae* nas colorações de Gram e/ou azul de metileno e crescimento puro em gelose chocolate é feito o teste da oxidase e se positivo, prosseguir para confirmação da identificação com carta NH no Vitek2 e envio da placa semeada para o INSA, onde é feito o antibiograma; - Cultura pura em *MacConkey* com odor característico de *Pseudomonas* sp., quando em número significativo, é feito o teste da oxidase e se este for positivo, é feita a identificação com carta GN e respetivo antibiograma; - Colónias

verde-azuladas em gelose *Candida* identifica presuntivamente *C. albicans*, sendo feita a identificação definitiva no Vitek2, recorrendo à carta de identificação ID YST, assim como para colónias de cor branca, tratando-se de outras espécies de *Candida sp.*, onde também é necessária a identificação no Vitek2 para saber a espécie presente [33].

9.4.4. Exsudado faríngeo

A colheita deste exsudado pressupõe que o utente não tenha comido ou feito a higiene oral nessa manhã. A colheita é feita com uma zaragatoa em meio de transporte (meio de Stuart), onde esta deve ser raspada em toda a superfície da faringe e amígdalas, evitando o contacto com as gengivas, língua e saliva, de modo a evitar contaminações.

A partir desta zaragatoa é feito um esfregaço, que vai ser corado por Gram e a zaragatoa é semeada em Gelose de sangue em atmosfera rica em CO₂ (pesquisa de bactérias anaeróbias facultativas como *Streptococcus β*- hemolítico do grupo A de Lancefield, uma das principais causas de faringite), meio de Sabouraud (pesquisa de fungos), Gelose MSA (pesquisa de *Staphylococcus aureus*) e ainda em meio *Todd-Hewitt* (meio seletivo para *Streptococcus β*- hemolítico), sendo que este último vai ser repicado para Gelose de sangue às 24h. A leitura destes meios é feita às 24h e 48h de incubação.

O clínico prescritor pode ainda orientar para a pesquisa de *Neisseria gonorrhoeae*, *Bordetella pertussis* ou *Corynebacterium diphtheriae*, sendo que estes dois últimos são semeados em meios específicos por laboratórios subcontratados.

Crescimento na Gelose sangue com beta hemólise após a identificação presuntiva, é feita a identificação definitiva no Vitek2, utilizando cartas GP (Gram positivas) para *Streptococcus β*- hemolítico e *S. aureus*, seguido do respetivo antibiograma. No caso de se tratar de uma espécie de *Candida*, apenas é feita a identificação da espécie, informando-se o clínico da mesma [33].

9.4.5. Exsudado auricular

Esta amostra é colhida no canal auricular externo, por um técnico, usando uma zaragatoa em meio de transporte. Esta é usada para fazer um esfregaço em lâmina, onde é feita uma coloração de Gram para observação ao microscópio e para fazer a sementeira nos meios de Gelose de Sangue (pesquisa de *Streptococcus sp.*), Gelose *Candida*, meio de Sabouraud simples em rampa (pesquisa de fungos filamentosos, como é o caso de *Aspergillus sp.*), Gelose MSA (pesquisa de *Staphylococcus sp.*), Gelose de *MacConkey* e Gelose de chocolate (sendo que estes últimos vão ser encubados em atmosfera rica em CO₂).

Os meios são lidos às 24h e 48h, sendo que no caso de alguns fungos com crescimento lento, os meios são lidos após 5 dias. A sementeira destes meios está orientada para a pesquisa de *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e leveduras e o procedimento a seguir é: - α -hemólise em Gelose de Sangue, aparecem colónias com halo esverdeado, cuja identificação presuntiva sugere *S. pneumoniae*, seguida de carta de identificação e respetivo antibiograma no Vitek2; - β -hemólise em gelose de sangue é feito o teste Slidex Strepto. A para identificação presuntiva de *Streptococcus* β -hemolítico, seguido de carta de identificação GP (será explicado no próximo capítulo) e respetivo antibiograma; - Colónias transparentes em gelose chocolate é feita a identificação com a carta NH no Vitek2, podendo tratar-se de *Haemophilus influenzae*. O respetivo antibiograma é feito manualmente por difusão, usando o meio ATB haemo, da Biomerieux; - Colónias amarelas em gelose MSA é feito o teste Pastorex Staph Plus para identificação presuntiva de *S. aureus*, seguido de carta de identificação GP e ATB com carta AST-619; - Colónias verdes-azuladas em gelose *Candida* identifica presuntivamente *Candida albicans*, mas se obtivermos colónias brancas devemos fazer uma identificação com carta YST no Vitek2, para saber qual a espécie presente, sendo que o antibiograma apenas é feito quando requisitado pelo médico prescritor; - Fungos filamentosos em gelose Sabouraud são identificados por observação microscópica com o auxílio de um atlas que relaciona o aspeto macroscópico das colónias com o aspeto microscópico, sendo o antifungigrama realizado no INSA; - Colónias grandes e translúcidas em gelose *MacConkey* e com um cheiro característico de *Pseudomonas sp.* é feito o teste da oxidase e se este for positivo, procede-se para a identificação com carta GN e ATB [33].

9.4.6. Exsudado Nasal

Esta colheita é feita com recurso a 2 zaragatoas finas e estéreis, uma para cada narina, e colocadas em meio de transporte. A zaragatoa deve inserir-se na narina até aos cornetos nasais e deve ser rodada contra a mucosa. O utente não deve usar antibióticos ou sprays nasais até 5 dias anteriores à colheita e não deverá assoar-se nos 30 minutos antecedentes à mesma.

Com cada zaragatoa é feito um esfregaço para ser corado por coloração de Gram e a sementeira nos meios adequados: Gelose de sangue (*Streptococcus sp.*) incubado em atmosfera rica em CO₂, Gelose MSA (*Staphylococcus aureus*), Gelose *Candida* (leveduras), sendo estes lidos às 24h e 48h de incubação. O procedimento a seguir após a leitura das placas está referido no tópico anterior.

9.4.7. Exsudado purulento

Esta colheita é aplicável a feridas e secreções, que não as mencionadas anteriormente, onde é usada uma zaragatoa estéril em meio de transporte. Esta vai servir para fazer um esfregaço em lâmina, que é corada por coloração de Gram e, posteriormente, para semear nos seguintes meios: Gelose de sangue (*Streptococcus sp.*), gelose MSA (*S. aureus*), Gelose *Candida* (leveduras), Gelose de *MacConkey* (*Enterobacteriaceae*).

Se o clínico prescriptor suspeitar de outras espécies que não as acima mencionadas, este deve fazer essa referência para que se utilizem os meios de cultura mais adequados (ex: *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, geralmente associados a feridas localizadas na região genital).

O procedimento a seguir após a leitura dos meios às 24h e 48h é o indicado nos tópicos anteriores.

9.5. Expetoração

Esta colheita deve ser feita em jejum, no período da manhã, e após lavagem com água previamente fervida e arrefecida, de modo a minimizar possíveis contaminações salivares. A recolha deve ser feita após tosse profunda e desprezando a saliva, para um contentor estéril. A manipulação desta amostra deve ser feita numa câmara de fluxo laminar, devido ao elevado risco de contaminação para o manipulador.

Quando é feito um pedido de análise à expetoração, este pode pedir um exame bacteriológico e/ou um exame para pesquisa de micobactérias e fungos. No primeiro caso apenas é feita a sementeira nos meios de Gelose MSA (*S. aureus*), Gelose de sangue (*S. pneumoniae*), Gelose de *MacConkey* (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e outras Gram negativas), sendo lidos às 24h, 48h e 72h.

No segundo caso, em que o pedido inclui também a pesquisa de micobactérias e fungos, é feita primeiramente a análise bacteriológica acima descrita e, de seguida, faz-se uma fluidificação e descontaminação da amostra com recurso a reagentes do kit, que permite eliminar microbiota comensal. De seguida, são feitos dois esfregaços, um para corar por coloração de Gram e o outro por Ziehl-Neelsen. Esta segunda coloração serve para o exame direto para pesquisa de bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR), como é o caso das Micobactérias, onde se insere o *Mycobacterium tuberculosis* ou Bacilo de Koch (BK). As Micobactérias não crescem nos meios de cultura tradicionais, pelo que são necessários meios como o de Löwestein-Jensen para semear a amostra [38].

No caso da pesquisa de fungos filamentosos, a amostra é semeada em meio de Sabouraud com cloranfenicol e gentamicina, sendo lido aos 5 dias. No caso de pesquisa de BK, a amostra é semeada no meio de Löwenstein-Jensen, a partir do sedimento do tubo centrifugado após a descontaminação, e fica a incubar 60 dias na estufa a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$. Ao longo deste período de incubação, vai-se observando o crescimento das colónias e devem arejar-se os tubos, aliviando a rosca, sem abrir o tubo (para entrada de algum O_2). Quando se observa crescimento de colónias com aspeto rugoso, esbranquiçadas e tipo “couve-flor” (ver Figura 17), deve fazer-se novo esfregaço em lâmina e corar por Ziehl-Neelsen para confirmar a presença de *Mycobacterium tuberculosis*, causador da tuberculose.



Figura 17. Colónias de BK em meio Löwestein-Jensen.

9.6. Amostras para exames micológicos

Nas amostras para a pesquisa de fungos a partir de tecidos queratinosos, quer sejam cabelo, unhas, pele ou outros, a sua colheita é feita com recurso a raspagem da zona afetada e da sua periferia para uma caixa de Petri estéril, de modo a tentar recolher fungos saprófitos e Dermatófitos (organismos que se alimentam de matéria orgânica em decomposição e queratina, respetivamente). O primeiro passo consiste no exame direto com dissolução de um pouco da amostra numa solução de hidróxido de potássio (KOH), durante 10 a 30 minutos, para que a queratina seja parcialmente digerida e observação ao microscópio para ver se existem leveduras ou hifas. De seguida, é feita a sementeira da amostra em meio de Sabouraud com antibióticos (cloranfenicol e gentamicina), de modo a inibir o crescimento bacteriano, em Sabouraud com actidiona e cloranfenicol, que inibe algumas leveduras e fungos contaminantes, e também em Sabouraud líquida, sendo estes incubados durante um mês, sendo feita a observação dos mesmos a cada cinco dias [33].

Caso se observe crescimento, faz-se uma repicagem para meio de Malte e espera-se que cresça um micélio aéreo que permita a identificação dos fungos. Além do recurso à morfologia macroscópica dos mesmos, à velocidade de crescimento, é feita a observação microscópica dos micélios, colocados sob uma lâmina com o auxílio de fita cola (para não estragar as estruturas) com uma gota de azul de lactofenol (cora estruturas fúngicas).

A exceção à sementeira em meio de cultura ocorre na suspeita de pitiríase versicolor, provocada por *Malassezia furfur*, uma vez que esta não cresce nos meios de cultura utilizados, sendo a observação direta de hifas com esporos em cacho o diagnóstico definitivo [39].

9.7. Identificação bacteriana e Antibiograma

Após a leitura dos meios e a execução dos testes complementares, segue-se a identificação definitiva das espécies e respetivo antibiograma, quando este se aplica. No Labeto estas etapas são realizadas num aparelho semiautomático, o Vitek2 da *Biomerieux*, que utiliza cartas com diversos substratos, no caso das cartas de identificação, e que através de reações colorimétricas revelam a espécie presente (o próprio equipamento executa os testes e faz a leitura das cartas, passando os dados diretamente para o sistema informático).

No que toca às cartas para testar a sensibilidade aos antibióticos, cada carta contém uma gama de antibióticos, de acordo com as normas EUCAST e CLSI, que se adequam a determinado grupo de bactérias, pelo que a escolha da carta adequada ao tipo de bactéria é fundamental.

O equipamento dispõe ainda de um sistema avançado que incorpora as regras e fenótipos estabelecidos pelas entidades referidas anteriormente, o que leva a que sempre que surja uma resistência desconhecida, este emita um resultado incoerente, permitindo ao técnico reavaliar o tipo de carta usada ou ainda emitindo uma chamada de atenção quando surgem microrganismos alerta (por exemplo, aparecimento de novas resistências, organismos multirresistentes ou organismos de reporte obrigatório), que têm de ser reportados ao INSA e ao SINAVE (Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica, no qual é necessário notificar doenças de declaração obrigatória).

As amostras a serem analisadas neste aparelho são primeiramente preparadas num aparelho, o Smart Carrier do mesmo fornecedor, onde são colocados tubos para serem feitas diluições das amostras, a partir dos meios de cultura previamente semeados. O suporte funciona em poços aos pares, isto é, no primeiro poço é feita a identificação da bactéria, num tubo inoculado a 0,5-0,63 MacFarland (para Gram positivas e Gram negativas) e no segundo poço é feito o antibiograma correspondente (ver Tabela 10).

Tabela 10. Tipo de carta de identificação e de suscetibilidade aos antimicrobianos consoante o tipo de bactéria e o produto analisado.

Tipo de bactérias	Produto analisado	Carta de Identificação	Carta de suscetibilidade aos antimicrobianos
Bacilos Gram negativo	Urina	ID GN	AST-N359
	Outros produtos	ID GN	AST-355
<i>Pseudomonas</i> e Bacilos Gram negativos multirresistentes	-----	ID GN	AST-373
Cocos Gram positivos	-----	ID GP	AST-P648 (<i>Staphylococcus</i> sp.), AST-P586 (<i>Enterococcus</i> sp.) e P5T03 (<i>S. agalactiae</i> , <i>Streptococcus</i> β - hemolítico)
<i>Neisseria</i> sp, <i>Haemophilus</i> sp ou <i>Moraxella</i>	-----	ID NH	-----
Leveduras	-----	ID YST	-----

10. Controlo de Qualidade – Microbiologia

O controlo de qualidade dos reagentes e equipamentos é fundamental para a confiança e fiabilidade dos resultados, pelo que este é um dos fatores de maior importância no Labeto. Para isso, são feitos dois tipos de controlos: o controlo interno, feito com regularidade e por comparação com valores conhecidos; e o controlo externo, feito através da participação em Programas de Avaliação Externa da Qualidade do INSA, nas áreas da Microbiologia, Micologia e Parasitologia. O controlo de qualidade interno é feito nos corantes usados para as colorações, através do uso de estirpes referência de *S. aureus* e *E.coli*, e nos meios de cultura, usando estirpes ATCC (*American Type Culture Collection*). São também usadas estas estirpes para o controlo das cartas AST do Vitek. Os testes complementares usados para a identificação presuntiva contêm já nos seus kits os controlos positivos e negativos, que são testados cada vez que é feito o teste [40].

II. Caso Clínico

Um utente do sexo feminino, com 56 anos, apresenta-se no laboratório com dores no ouvido esquerdo levando o médico a suspeitar de uma infeção. É pedido um exsudado auricular deste mesmo ouvido, que é colhido com uma zaragatoa em meio de cultura. A partir desta é feita uma lâmina para observação e inoculam-se os seguintes meios: Gelose Sangue, gelose MSA e Gelose *MacConkey*.

Ao fim de 24h foi feita a leitura dos meios (Figura 18).

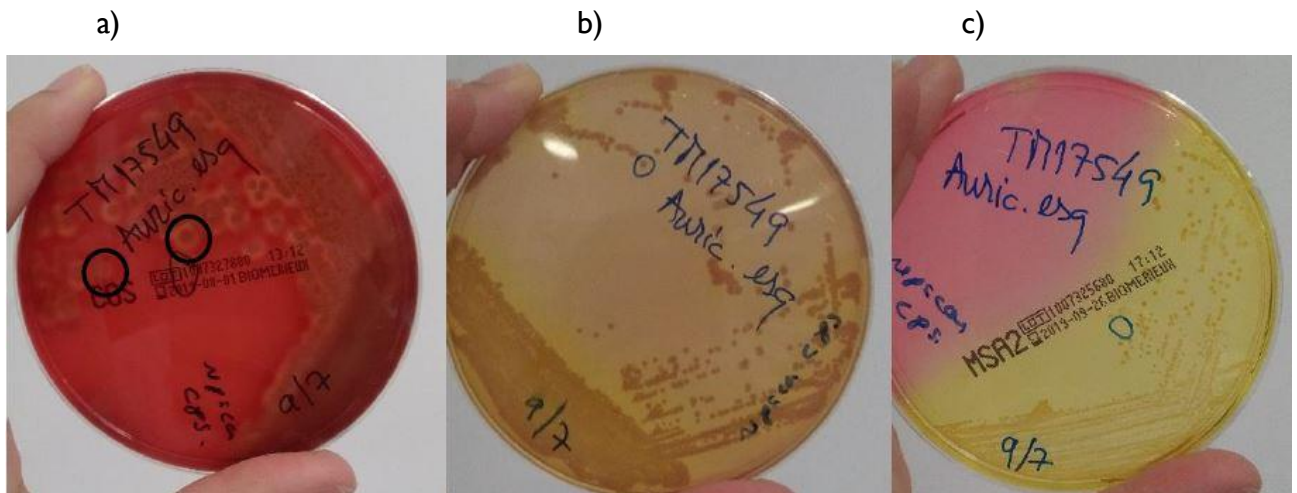


Figura 18. Leitura dos meios às 24h de incubação: a) 2 colónias distintas em COS; b) 1 tipo de colónias em Gelose *MacConkey*; c) 1 tipo de colónia em MSA.

Uma vez que na gelose COS se observaram dois tipos de colónias distintas, o passo seguinte foi repicar uma colónia isolada de cada para CPSE (meio cromogénico), assim como uma colónia isolada dos meios de *MacConkey* e MSA, ficando a incubar durante 24h.

No dia seguinte fez-se a leitura das repicagens para CPSE e obtiveram-se os resultados observados na Figura 19a.

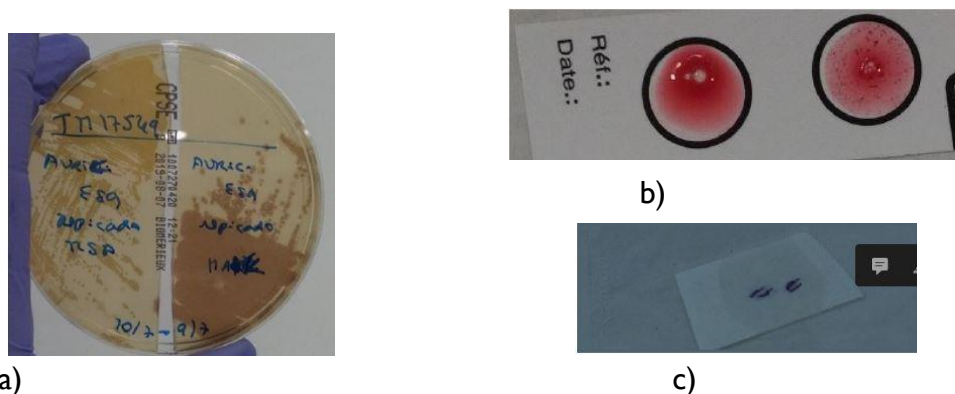


Figura 19. a) Leitura do meio CPSE após 24h; b) Teste de aglutinação *STAPH Plus* positivo; c) Teste da oxidase positivo.

Após a repicagem observam-se duas colónias distintas com diferente morfologia e cor, ambas crescem em Gelose de Sangue (COS), uma vez que se trata de um meio muito rico, mas pouco seletivo. A espécie que cresce em gelose MSA, tornando o meio amarelo, é indicativo da presença de *S. aureus*, pelo que é feito o teste de aglutinação *STAPH Plus*, onde se obteve um resultado positivo. A Gelose de *MacConkey* é seletiva para bactérias Gram negativas, podendo tratar-se de uma *Enterobacteriaceae*, de *Pseudomonas sp.* ou outra espécie. Quando é feita a repicagem para CPSE, as colónias crescem com uma cor acastanhada e têm um odor característico, tipo sabonete, fazendo suspeitar de uma *Pseudomonas sp.*. Fez-se então o teste da oxidase, que deu positivo (aparece cor violeta), permitindo uma identificação presuntiva da espécie.

O passo seguinte consiste em fazer a identificação definitiva das espécies e respetivo teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, recorrendo a uma carta ID GP e AST-P648 (para a primeira espécie) e a uma carta ID GN e AST-N373 (para a segunda espécie). Os resultados que se obtiveram foram de encontro às nossas suspeitas:

1) A primeira espécie foi identificada como *S. aureus*, com o respetivo ATB: estirpe sensível a penicilina, meticilina, cefoxitina, gentamicina, imipenemo, vancomicina, tetraciclina, trimetoprim + sulfometoxazol e resistente a eritromicina e clindamicina.

2) A segunda espécie foi identificada como *Pseudomonas aeruginosa* com o respetivo ATB: sensível a piperacilina + tazobactam, ceftazimida, aztreonam, imipenemo, meropenemo, amicacina, gentamicina, tobramicina, ciprofloxacina, levofloxacina e resistente a ticarcilina.

Esta espécie é naturalmente resistente à ampicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, cefazolina, cotrimazol, entre outros.

12. Bioquímica

A Bioquímica é uma área multidisciplinar, que têm por objetivo determinar os parâmetros bioquímicos permitindo a sua utilização no diagnóstico, tratamento, monitorização ou prevenção da doença. O estudo bioquímico permite compreender processos metabólicos, e com as informações obtidas, inferir sobre o estado funcional dos órgãos em particular ou no envolvimento de outros órgãos ou estruturas relacionadas. Tudo deverá funcionar num equilíbrio perfeito, em cadeia, em que o mau funcionamento de um elemento condiciona o funcionamento de todos os outros.

No departamento de Bioquímica no Laboratório Labeto são processadas amostras de sangue total, soro, plasma e urina. Aqui faz-se o doseamento de diversos parâmetros para

avaliação de função renal, hepática, cardíaca, pancreática, metabolismo de lípidos, equilíbrio eletrolítico, abuso de drogas e terapêutica farmacológica.

Este sector encontra-se dividido em três partes. Na primeira, as amostras são recebidas e centrifugadas 10 minutos a 3000 rpm para se obter o soro. Na segunda são introduzidos no *CORE LAB* que faz a triagem, aliquotagem e armazenamento das amostras e por fim para a determinação da grande maioria dos parâmetros bioquímicos existem dois Advia 2400 da Siemens que estão ligados à cadeia.

Após a validação analítica, os resultados obtidos são interpretados. A interpretação dos resultados obtidos não é apenas uma comparação com os valores de referência, classificando-os como normais ou anormais, é necessário atender ao facto de que algumas pessoas sem qualquer tipo de problema podem ter resultados fora dos valores de referência, e que, pessoas doentes podem apresentar valores normais. Por isso, devem-se comparar sempre os resultados com os valores basais anteriores. Esta interpretação é efetuada aquando da validação biopatológica, para a qual é fundamental o histórico do cliente.

Valores que não sejam consistentes com a interpretação são confirmados na mesma amostra e se necessário é pedida nova amostra.

Há análises que devem ser considerados em conjunto para estabelecer padrões que indiquem a presença de determinada doença ou anomalia.

I3. Imunologia

No laboratório Labeto, a Imunologia está no mesmo departamento que a Bioquímica. No entanto, existem certas análises que são feitas com recurso a técnicas imunológicas noutras secções, como é o caso da Serologia Infeciosa e da Auto-Imunidade.

Para além de 3 *ADVIA CENTAUR XP* que estão na cadeia *Core Lab* o Labeto tem ainda um Immulite 2000 (ambos da Siemens) um VIDAS e o *UNICAP*.

Neste departamento são efetuados os doseamentos de marcadores tumorais, hormonas, marcadores virais, parâmetros do grupo TORCH e os RAST's.

Estas técnicas de determinação dos parâmetros analíticos podem diferir no princípio do imunoensaio (ensaio competitivo ou não-competitivo/*sandwich*) e no método de deteção do complexo antigénio-anticorpo (métodos radioativos, fluorescentes, quimioluminescentes, electroquimioluminescentes e imunoturbidimetria).

As amostras chegam ao departamento de imunologia em tubos apropriados que permitem a coagulação do sangue e são centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos.

Assim quando se colocam os tubos no *Core Lab*, a cadeia distribui os tubos pelos aparelhos que iniciam os testes pedidos anteriormente enviando depois o resultado para o computador, onde um técnico faz a validação analítica, e onde os resultados obtidos são interpretados biopatologicamente. Tal como noutras valências devem-se comparar sempre os resultados com os valores basais anteriores. Esta interpretação é efetuada aquando da validação biopatológica, para a qual é fundamental o histórico do cliente.

14. Conclusão

A realização deste estágio permitiu-me aprofundar os conhecimentos teóricos que adquiri durante o meu mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas e no Mestrado em Análises Clínicas, bem como a sua aplicação à prática, permitindo sem dúvida consolidá-los.

A área das Análises Clínicas está em constante crescimento e evolução, devido à importância clínica das mesmas e ao aparecimento de cada vez mais marcadores com elevada especificidade. Assim sendo, é de realçar que o laboratório Labeto se mantém na vanguarda, atualizando os equipamentos usados, de modo a processar um maior número de amostras num curto espaço de tempo, a rentabilizar os reagentes e aparelhos de forma a obter resultados com maior rapidez e confiança. Deste modo, é inevitável o uso de aparelhos automáticos e semi-automáticos, com elevado poder de processamento, que agilizam a rotina laboratorial, de modo a rentabilizar todos os fatores acima mencionados, mas com uma contrapartida, o trabalho deixa de ser feito manualmente, o que significa que os recursos humanos têm tendência a diminuir dentro de um laboratório.

A tecnologia e a automatização permitiram, claramente, uma maior eficiência, uma maior produtividade, uma menor variabilidade humana, uma menor exposição a fluidos biológicos associada a um menor risco de contaminação e também uma maior rentabilização destes laboratórios.

Em suma, este estágio sensibilizou-me principalmente para a responsabilidade que o Técnico Superior tem em assegurar a qualidade de todo o processo analítico até à validação biopatológica, tendo sempre um espírito crítico.

Bibliografia

- 1 - SILVA, João; BEATO, Sílvia; RODRIGUES, Francisco - Anticoagulantes & Tubos de colheita. Castelo Branco: Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias. [Consultado a 16/04/2020]. Disponível em: <https://repositorio.ipcb.pt/bitstream/10400.1/1/626/1/Poster%20Anticoagulantes%20joao%20Silva%5B1%5D.pdf>
- 2 - HOFFBRAND, A. Victor; MOSS, Paul A.H. - Fundamentos em Hematologia de Hoffbrand. 7ª Ed, Artmed, 2018. ISBN 9788582714508
- 3 - TERRA, Paulo. - Coagulação: interpretação clínica dos testes laboratoriais de rotina. 2ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2001. ISBN 8573792795
- 4 - Sysmex; Série-XN - Tecnologia e parâmetros clínicos avançados, [consultado a 19/04/2020], disponível em: <https://www.sysmex.com/la/PT/Products/Hematology/XNSeries/Pages/XN-1000-Hematology-Analyzer.aspx>.
- 5 - PORTUGAL. Direção-Geral da Saúde - Prescrição e determinação do hemograma. Lisboa: DGS, 2013.
- 6 - PIVA, Elisa *et al.* - Clinical Utility of Reticulocyte Parameters. *Clinics in Laboratory Medicine*, Vol.35, nº1 (2015) p. 133–163.
- 7 - BAIN, Barbara J. *et al.* - Dacie and Lewis practical haematology. 11ª Ed., Elsevier Churchill Livingstone, 2012. ISBN 9780702069253.
- 8 - TURGEON, Mary Louise - Clinical Hematology: Theory and Procedures. 4ª Ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2005. ISBN 0–7817–5007–5
- 9 - BARBARA J. BAIN - Células Sanguíneas – Um guia prático. 5ª Ed, Porto Alegre: Artmed Editora, 2016. ISBN 9788582713310
- 10 - MORAIS, Marcio Cruvinel - Laboratório Clínico: Teoria e Prática. 1ª Ed. Rio Verde, 2013. ISBN 9788580454512
- 11 - THEML, Harald.; DIEM, Heinz.; HAFERLACH, Torsten - Color Atlas of Hematology: Practical Microscopic and Clinical Diagnosis. 2ª Ed, New York: Thieme, 2004. ISBN 1–58890–193–9
- 12 - SMOCK, K. J.; PERKINS, S. L. - Thrombocytopenia: An update. *International Journal of Laboratory Hematology*. Vol.36, nº3 (2014), p. 269–278.

- 13 - RODAK, BeARNdette. F. - Hematology: Clinical Principles and Applications. 2ª Ed, Philadelphia:W. B. Saunders Company, 2002. ISBN 9789500618762.
- 14 - G GREER, John P. et al. - Wintrobe's clinical hematology. 13ªEd, Philidelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2014. ISBN 9781451172683
- 15 - SANTOS, V.M. dos; CUNHA, S.F de C. da; CUNHA, D.F. da - Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações. Rev Ass Med Brasil. Vol. 46, nº3 (2000), p. 232–6
- 16 - UTHMAN, Ed - Understanding anemia. The Nurse practitioner. 1ª Ed. University Press of Mississipi, 1998. ISBN 1–57806–038–9
- 17 - HOFFBRAND, A. Victor; MOSS, Paul A.H.; PETIT, J.E. - Fundamentos em Hematologia. 5ªEd, Artmed Editora, 2009. ISBN 8536314532
- 18 - COELHO, Tiago Henriques; MOREIRA, Adelino Leite – Função Hemostática e sua Avaliação, Texto de Apoio. Porto: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 2011.
- 19 - FOWLER, A.; PERRY, D. J. - Laboratory monitoring of haemostasis. Anaesthesia. Vol.70 nº1 (2015), p.24–72. [Consultado a 10/05/2020]. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/anae.12919>
- 20 - RODGERS, Griffin P.; YOUNG, Neal S - Manual Bethesda de Hematologia Clínica. 3ªEd, Rio de Janeiro, Revinter Lda, 2017. ISBN 978–85–372–0687–4
- 21 - Mercadanti M., Romero A., Lippi G., The measurement of hemoglobin A2 and F in stored whole blood samples, Clin Lab., 2011, 57 (9–10):777–80.
- 22 - Daniels G., Bromilow I., Essential Guide to Blood Groups, 1st Edition, UK: Blackwell Publishing, 2007.
- 23 - Harvey G., David J., Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine, 11ª Edição, Oxford, Wiley-Blackwell, 2005.
- 24 - Zhou X., Yan L., Zhao Y., Application of micro-column gel cards assay for direct Coombs test in diagnosis of autoimmune hemolytic anemia, Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi, 2012 Jan, 33 (1):31–3.
- 25 - MURRAY, Patrick; ROSENTHAL, Ken; PFALLER, Michael A - Microbiologia Médica. 8ª Ed, Elsevier Editora Lda., 2017. ISBN 9788535286458
- 26 - S. KING e W. METZGER, "A New Plating Medium for the Isolation of Enteric Pathogens," American Society for Microbiology, vol. 16, pp. 577–578, 1968.

- 27 - L. JEFFRIES, "Novobiocin-Tetrathionate Broth: A Medium of improved selectivity for the isolation of Salmonellae from faeces.," *JouARNI of Clinical Pathology*, vol. 12, pp. 568–571, 1959.
- 28 - S. PALUMBO e J. ALFORD, "Inhibitory Action of Tetrathionate Enrichment Broth," *American Society for Microbiology*, pp. 970–976, 1970.
- 29 - Z. HAN, E. LAUTENBACH, N. FISHMAN e I. NACHAMKIN, "Evaluation of mannitol salt agar, CHROMagar Staph aureus and CHROMagar MRSA for detection of meticillin-resistant Staphylococcus aureus from nasal swab specimens," *JouARNI of Medical Microbiology*, vol. 56, pp. 43–46, 2006.
- 30 - A. FONSECA, "Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia.," 2004.
- 31 - J. SIMERVILLE, W. MAXTED e J. PAHIRA, "Urinalysis: A Comprehensive Review," *American Family Physician*, vol. 71, pp. 1153–1162, 2005.
- 32 - S. LYNCH e O. PEDERSON, "The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease," *New England JouARNI of Medicine*, vol. 375, pp. 2369–2379, 2016.
- 33 - MARTOS, Pedro García; BARRIO, María Teresa Fernández del; SALIDO, Fernando Paredes - **Microbiología clínica aplicada**, 3ª Ed, Espanha, Editora Díaz de Santos, S.A., 1997. ISBN 84-7978-281-1
- 34 - E. GALANIS, "Campylobacter and bacterial gastroenteritis.," *CMAJ*, vol. 177, pp. 570–571, 2007.
- 35 - H. WINN, "Group B Streptococcus Infection in Pregnancy," *Clinics in Perinatology*, vol. 34, p. 387–392, 2007.
- 36 - B. FORBES, D. SAHM e A. WEISSFELD, *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, 12 ed., TILLE, 2007.
- 37 - C. ISON, S. DAWSON, J. HILTON, G. CSONKA e E. C., "Comparison of culture and microscopy in the diagnosis of Gardnerella vaginalis infection.," *JouARNI of Clinical Pathology*, vol. 35, pp. 550–554, 1982.
- 38 - E. LEE, J. BRENNAN e S. BESRA, "Mycobacterium tuberculosis Cell Envelope," em *Tuberculosis*, Springer, 1996, pp. 1-27.
- 39 - M. MARCON e D. POWELL, "Epidemiology, diagnosis, and management of Malassezia furfur systemic infection.," *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.*, vol. 7, pp. 161–175, 1987.

40 - K. BERNIS, E. BOND e F. MANNING, Resource Sharing in Biomedical Research, 1996.

Anexo I

Tabela II. Valores de referência do hemograma utilizados no Labeto com base na Norma nº 063/2011 (Atualizada a 12/09/2013 da DGS)

Parâmetro (unidades)	Sexo	Idade (anos)	Valor de Referência
RBC ($\times 10^{12}$ / L)	M	> 11	4,31 – 6,40
	F	> 11	3,85 – 5,20
Hb (g/dL)	M	> 11	13,6 – 18,0
	F	> 11	11,5 – 16,0
Ht (%)	M	> 5	39,8 – 52,0
	F	> 5	34,7 – 46,0
VCM (fL)	M/F	> 11	80,0 – 97,0
HCM	M/F	> 5	26,0 – 34,0
CHCM	M/F	> 6 meses	32,0 – 36,0
RDW (%)	M/F	> 2 dias	11,5 – 15,0
PLT ($\times 10^9$ / L)	M/F	> 2 meses	140 – 440
VPM (fL)	M/F	-	6,5 – 12,4
WBC ($\times 10^9$ / L)	M/F	> 11	4,0 – 10,0
NEU ($\times 10^9$ / L)	M/F	> 11	1,5 – 8,0
LYM ($\times 10^9$ / L)	M/F	> 11	0,8 – 4,0
MONO ($\times 10^9$ / L)	M/F	> 11	0,0 – 1,2
EOS ($\times 10^9$ / L)	M/F	> 11	0,0 – 0,3
BASO ($\times 10^9$ / L)	M/F	> 11	0,0 – 0,3