



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Maria João Cavadas Martins

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Análises Cínicas
orientado pela Doutora Olga Maria Antunes Rodrigues Carvalho
Cardoso e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade
de Coimbra

Setembro de 2023



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Maria João Cavadas Martins

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Análises Cínicas
orientado pela Doutora Olga Maria Antunes Rodrigues Carvalho
Cardoso e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de
Coimbra

Setembro de 2023

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer a minha mãe e ao meu pai, por todos os conselhos dados e por sempre me incentivarem a seguir os melhores caminhos, sem eles nunca seria o que sou hoje.

Ao meu irmão que a sua maneira demonstra a admiração e amor que sente por mim.

Ao meu avô Ilídio e a minha avó Lurdes por todo o amor e carinho e por sempre me apoiarem.

Agradeço eternamente à minha avó Tó, a quem dedico este relatório, por me fazer sentir sempre especial!

Agradeço aos meus amigos de Mogadouro, ao meu grupo de Coimbra e aos meus afilhados pela amizade demonstrada ao longos dos anos!

Agradeço em especial a Sofia por 6 meses incríveis na capital, e mesmo estando a 500 km de Mogadouro senti me sempre em casa.

Agradeço ao Diogo pelo companheirismo, pela sua calma e por acreditar sempre em mim e nas minhas capacidades.

Agradeço a Marlene por ter sido um ombro amigo durante estes meses.

Agradeço a todo pessoal da Germano de Sousa e a Doutora Rita por me terem recebido de braços abertos nesta experiência, por todo o apoio e compreensão.

Por fim agradeço à Professora Doutora Olga Cardoso pela disponibilidade e orientação prestada na elaboração deste relatório.

Índice

1. Introdução.....	1
2. Caracterização do Laboratório.....	2
3. Fluxo De Trabalho no Laboratório.....	3
4. Controlo de Qualidade.....	5
4.1 Controlo de Qualidade Interno.....	5
4.2 Controlo de Qualidade Externo.....	6
5. Imunologia Clínica.....	7
6. Bioquímica Clínica.....	9
7. Hematologia Clínica.....	11
7.1 Equipamentos e Metodologias.....	11
7.2 Hematopoiese.....	14
7.3 Hemograma.....	16
7.3.1 Eritrograma.....	16
7.3.1.1 Alterações Qualitativas e Quantitativas do Eritrograma.....	19
7.3.2 Leucograma.....	23
7.3.2.1 Alterações Qualitativas e Quantitativas do Leucograma.....	25
7.3.3. Trombocitograma.....	26
7.3.3.1 Alterações Qualitativas e Quantitativas do Trombocitograma.....	27
7.4 Contagem de Reticulócitos.....	29
7.5 Velocidade de Sedimentação Eritrocitária.....	29
7.6 Hemóstase.....	30
8. Microbiologia Laboratorial.....	33
8.1 Equipamentos Automatizados.....	34
8.2 Meios de Cultura.....	37
8.3 Amostras Biológicas.....	39
8.3.1 Urina.....	41

8.3.2 Fezes.....	42
8.3.2.1 Coprocultura.....	43
8.3.2.2 <i>Clostridium difficile</i>	44
8.3.2.3 Exame Parasitológico.....	44
8.3.2.4 Adenovírus e Rotavírus	45
8.3.3 Exsudados Urogenitais (Uretral e Vaginal)	45
8.3.4 Líquido Cefalorraquidiano (LCR).....	47
8.3.5 Exsudados Purulentos.....	48
8.3.6 Líquidos das Cavidades Serosas	49
8.3.7 Amostras do Trato Respiratório	49
8.3.7.1 Trato Respiratório Superior.....	49
8.3.7.2 Trato Respiratório Inferior.....	50
8.4 Testes de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA)	51
9. Casos Clínicos.....	53
10. Conclusão.....	56
11. Bibliografia.....	57

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Parâmetros analíticos efetuados pelo Centaur Xp e Immulite 2000	8
Tabela 2 – Parâmetros analíticos efetuados pelo Advia Chemistry XPT	10
Tabela 3 – Alterações morfológicas de eritrócitos	20
Tabela 4 – Cinco tipos de leucócitos e características	24
Tabela 5 – Cartas do VITEK 2 e características	36
Tabela 6 – Processamento dos diferentes produtos biológicos	40
Tabela 7 – Parâmetros bioquímicos avaliados	54
Tabela 8 – Parâmetros serológicos avaliados	54

Índice de Imagens

Figura 1 – Representação Sysmex XN-9100-401.....	11
Figura 2 – Representação Sysmex CS-5100.....	13
Figura 3 – Representação Ves-Matic Cube 30 Touch	13
Figura 4 – Processo da Hematopoiese.....	15
Figura 5 – Esferocitose	20
Figura 6 – Acantocitose.....	21
Figura 7 – Drepanocitose.....	21
Figura 8 – Eliptocitose/Ovalocitose.....	21
Figura 9 – Ponteados Basófilos.....	21
Figura 10 – Corpos de Howell-Jolly	21
Figura 11 – Corpos de Pappenheimer	22
Figura 12 – Rouleaux	22
Figura 13 – Aglutinação	22
Figura 14 – Neutrófilos	24
Figura 15 – Eosinófilos.....	24
Figura 16 – Basófilos	24
Figura 17 – Linfócito.....	25
Figura 18 – Monócito.....	25
Figura 19 – Slide utilizado no VITEK MS	35
Figura 20 – Cartas de identificação e de TSA utilizadas no VITEK 2.....	35
Figura 21 – Gelose de CPSE dividida para duas amostras	42
Figura 22 –Gelose de HEKT com crescimento de <i>Salmonella spp.</i>	44
Figura 23 – Meio de SCG2 com crescimento de <i>Candida albicans</i>	46
Figura 24 – Método de Kirby-Bauer modificado	51

Abreviaturas e Siglas

Ac Anti-HBc – Anticorpo contra o AgHBc

Ac Anti-HBe – Anticorpo contra o AgHBe

Ac Anti-HBs – Anticorpo contra o AgHBs

Ac Anti-VHA – Anticorpo contra o Vírus da Hepatite A

Ac Anti-VHC – Anticorpo contra o Vírus da Hepatite C

Ac Anti-HIV – Anticorpo contra o Vírus da Imunodeficiência Humana

ACTH – Corticotropina

ADP – Amplitude de Distribuição Plaquetária

AEQ – Avaliação Externa de Qualidade

AFP – α -fetoproteína

AgHBe – Antígeno HBe do Vírus da Hepatite B

AgHBs – Antígeno da superfície/envelope do Vírus da Hepatite B

ALT – Alanina Aminotransferase

AST – Aspartato Aminotransferase

BHI – Caldo Cérebro-Coração

CAM – Gelose Campyloset

CEA – Antígeno Carcinoembrionário

CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

CID – Coagulação Intravascular Disseminada

CMI – Concentração Mínima Inibitória

CNA – Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro com Colistina e Ácido Nalidíxico

CQI – Controlos de Qualidade Interna

COS – Gelose de Sangue

CPSE – Gelose chromID™ CPS® Elite

DST – Doença Sexualmente Transmissível

EDA – Endoscopia Digestiva Alta

ESBL – Bactérias Produtoras de β -lactamases de Espectro Alargado

EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FA – Fosfatase Alcalina

Fator V – Nicotinamida Adenina Dinucleótido

Fator X – Hemina

fPSA – Antígeno Específico da Próstata Livre

FSH – Hormona Folículo-Estimulante
GGT – Gama-glutamiltransferase
GRAN – Gelose Granada
GRH – Hormona do Crescimento
HAEM – Gelose de Chocolate *Haemophilus spp*
Hb – Hemoglobina
HCM – Hemoglobina Corpuscular Médio
HEKT– Gelose Hektoen
HPG – IgG para diagnóstico de *Helicobacter pylori*
Ht – Hematócrito
IGF-I – Insulin-like Growth Factor I
INR – Razão Normalizada Internacional
LCR – Líquido Cefalorraquidiano
LH – Hormona Luteinizante
MCK – Gelose MacConkey
MIN – Minutos
MO – Medula Óssea
MRSA – *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistentes
MSA2 – Gelose de Chapman
NEQAS – United Kingdom National External Quality Assessment Service
NK – Células Natural Killer
RNA – Ácido Ribonucleico
PAP – Fosfatase Ácida Prostática
PSA – Antígeno Específico da Próstata
PTI – Púrpura Trombocitopénica Idiopática
PTT – Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado
PVX – Gelose de Chocolate + PolyVitex
RDW – Coeficiente de Dispersão Eritrocitária
RPM – Rotações por Minuto
SCG2 – Gelose de Sabouraud
SEQC – Sociedad Española de Medicina de Laboratorio
SGQ – Sistema de Gestão de Qualidade
T3 – Tri-iodotironina
T4 – Tiroxina
TBH – Caldo Todd Hedwitt

TG – Triglicerídeos
ThCG – Teste Gonadotrofina Coriônica Humana
TP – Tempo de Protrombina
TSA – Testes de Sensibilidade Antimicrobiana
TSH – Tiroestimulina
UFC – Unidade Formadora de Colônias
UTI – Infecções do Trato Urinário
VB12 – Vitamina B12
VCAT – Gelose de Chocolate PolyVitex
VCM – Volume Corpuscular Médio
VPM – Volume Plaquetário Médio
VSE – Velocidade de Sedimentação Eritrocitária

Resumo

O Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra permite a realização de um estágio curricular no 2º ano. O presente relatório descreve as atividades que realizei no Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa em Lisboa de janeiro a junho. Nas valências de Hematologia e Microbiologia descrevo os equipamentos e as metodologias utilizadas e de uma forma mais suscita abordo as valências de Imunologia e de Bioquímica. É apresentada ainda uma breve descrição do laboratório, do fluxo de trabalho e do sistema de gestão de controlo de qualidade que permite segurança, eficiência e qualidade ao processo analítico.

Abstract

The Master's Degree in Clinical Analysis at the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra allows a curricular internship in the 2nd year. This report describes the activities I carried out at the Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa in Lisbon from January to June. In the areas of Hematology and Microbiology I describe the equipment and methodologies used and in a more evocative way I address the areas of Immunology and Biochemistry. A brief description of the laboratory, workflow and quality control management system that allows safety, efficiency and quality to the analytical process is also presented.

I. Introdução

Análises Clínicas é uma área essencial no diagnóstico e na monitorização de inúmeras patologias e doenças fornecendo informações auxiliares para a prevenção e deteção precoce destas.

A colheita de diversos produtos como sangue, urina ou fluídos corporais permite a determinação de parâmetros, através de diversas metodologias, que fornecem dados relevantes sobre a saúde dos utentes.

O avançar da ciência e das tecnologias em si possibilitou uma modernização na área da Patologia Clínica, equipamentos com tecnologias mais avançadas e novas metodologias, permitem resultados mais fidedignos e precisos que se refletem num rápido e exato diagnóstico.

O estágio curricular do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra tem como objetivo solidificar os conhecimentos teóricos adquiridos ao longo dos dois anos de ensino e permitir aos alunos uma experiência profissional em contexto real num laboratório de Análises Clínicas.

O meu estágio foi realizado no Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa em Lisboa onde passei pelos quatro setores principais, Imunologia, Bioquímica, Hematologia, Microbiologia e tive oportunidade de acompanhar o pessoal técnico na triagem e nas áreas de Alergologia, Serologia, Patologia Clínica e Genética.

O estágio teve duração de 6 meses onde acompanhei a rotina diária, integrando-me nas equipas de trabalho, obtendo conhecimentos sobre os diferentes equipamentos, métodos e metodologias de cada área e os programas de controlo interno e externo do laboratório.

No presente relatório abordei resumidamente as áreas de Imunologia e de Bioquímica e de uma forma mais aprofundada as áreas de Hematologia e Microbiologia.

2. Caracterização do Laboratório

O Grupo Germano de Sousa é uma rede de laboratórios de Patologia Clínica fundada pelo Dr. Germano de Sousa em 1975 e é até hoje uma referência na área clínica, esta presente em mais de 12 hospitais e tem cerca de 550 postos de colheita.

O Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa Lisboa tem como Diretor Técnico o Dr. Germano de Sousa, fundador e médico patologista e a Dr^a. Rita Ribeiro como Coordenadora do Departamento Técnico.

Além do Laboratório Central onde estão presentes as áreas de Bioquímica, Imunologia, Hematologia, Microbiologia, Serologia, Alergologia e Patologia, o grupo dispõe de um Laboratório de Genética, o qual tive oportunidade de visitar e acompanhar os profissionais que nele trabalham.

O foco do Grupo Germano de Sousa é a inovação, qualidade e rigor de modo a satisfazer técnicos, clínicos e utentes, garantindo assim um rápido diagnóstico, uma eficaz monitorização e um correto prognóstico da doença.

É um laboratório que utiliza as técnicas, métodos e metodologias mais modernas acompanhando as mais recentes exigências da Medicina.

O Laboratório de Lisboa é em grande parte automatizado sendo o controlo de qualidade uma das maiores preocupações do Grupo. Todos os equipamentos são certificados pelos fabricantes e através da execução de calibrações e controlos, da participação em programas de avaliação externa da qualidade laboratorial nacionais e internacionais a precisão e exatidão são mantidas.

3. Fluxo De Trabalho no Laboratório

A fase pré-analítica é crucial para garantir a qualidade e confiabilidade dos resultados solicitados. Envolve a colheita, o transporte e o processamento das amostras antes de serem examinadas.

Nesta fase ocorrem a maioria dos erros analíticos, que posteriormente interferem no resultado dos parâmetros fornecendo informações incorretas aos clínicos e utentes.

No Laboratório Germano de Sousa para mitigar esta probabilidade existe uma secção dedicada à receção de amostras, ao registo de informação e ao devido armazenamento.

Durante a colheita é necessário conferir o nome do utente, as análises prescritas e se todas as condições estão reunidas para prosseguir.

O maior fluxo de amostras do Laboratório Germano de Sousa provém de postos externos, os produtos são transportados em malas térmicas por estafetas, e ao chegarem ao laboratório é lhes medida a temperatura para garantir que cada amostra mantém a temperatura adequada ao tipo de produto a que corresponde.

As amostras provenientes da sala de colheitas são transferidas de imediato para a triagem onde são processadas. De seguida, a cada tubo é atribuída uma etiqueta com um código de barras, nome do utente e um código alfanumérico para identificação.

Este código é necessário para análise dos parâmetros pedidos nos equipamentos, permite saber a origem e o tipo de produto a que pertence, sendo que cada extensão corresponde a um diferente, para exemplo o 0100 codifica amostra de soro ao tempo 0 minutos.

As amostras são depois registadas no sistema informático, Apollo, que possibilita a integração de todos os pontos de colheita, história clínica dos utentes, rastreabilidade das amostras, gravação dos resultados dos parâmetros fornecidos pelos equipamentos automatizados e validação biopatológica do processo analítico.

Na triagem, amostras não identificadas, com volumes insuficientes, amostras em recipientes inapropriados e outros, são rejeitadas e solicitada nova colheita.

As amostras aceites são, consoante necessidade, centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos e distribuídas pelas diferentes áreas de trabalho.

Nos diferentes setores, as amostras são analisadas por métodos manuais e automáticos.

Os resultados dos parâmetros são comparados com os valores de referência do laboratório e, em seguida, validados pelos clínicos consoante história clínica, ou caso necessário repetição de testes.

A equipa da triagem é também responsável pelo armazenamento e eliminação dos produtos biológicos. As amostras são eliminadas por indicação do sistema informático através do código de barras de cada produto, e cada um apresenta um determinado tempo de retenção em armazenamento específico.

Todos os dias, a equipa da triagem verifica a existência de amostras que é necessário enviar para laboratórios externos. Em determinados parâmetros há necessidade de confirmação por outras metodologias, sendo as amostras enviadas para laboratórios de referência nacionais ou internacionais.

4. Controlo de Qualidade

O controlo de qualidade é parte essencial em análises clínicas, a sua execução garante precisão, confiabilidade e exatidão dos resultados.

O grupo Germano de Sousa apresenta a certificação da Norma ISO 9001:2015 que através de um conjunto de padrões permite a implementação e manutenção de um sistema de gestão de qualidade (SGQ).

O laboratório apresenta controlos de qualidade interna (CQI) em todas os setores e participa também em diversos programas de avaliação externa de qualidade (AEQ).

A implementação de um sistema de controlos analíticos, internos e externos, confere ao laboratório uma segurança na máxima fiabilidade e rigor dos resultados, contribuindo para uma tomada de decisões clínicas mais assertivas, melhorando a qualidade do atendimento ao utente. O controlo de qualidade assegura ainda o bom funcionamento de todos os procedimentos e das metodologias clínicas e garante a repetibilidade e uniformidade dos resultados obtidos.

4.1 Controlo de Qualidade Interno

O controlo de qualidade interno consiste na avaliação de amostras fornecidas pelas casas comerciais com concentrações/características conhecidas pelos mesmos equipamentos e métodos que as amostras dos utentes.

Esta avaliação permite verificar se os resultados estão dentro de limites aceitáveis e se cumprem as regras de Westgard.

Cada setor apresenta um plano de CQI consoante os parâmetros analisados, os equipamentos e as metodologias utilizadas.

Na maioria dos setores, os controlos são passados de manhã antes do processamento das amostras dos utentes, e é utilizado sempre mais que um nível, nível normal e patológicos. Após os resultados, os equipamentos fornecem as cartas de Levey Jennings de cada controlo a partir de dados encontrados nas bulas de cada um.

Os critérios de análise de cada controlo são feitos pelo Responsável de Qualidade e pelo Diretor Técnico com base nas Regras de Westgard.

Deste modo, a passagem dos controlos permite assegurar o rigor dos resultados de cada parâmetro e identificar as não conformidades.

Quando aparece uma não conformidade, o laboratório aciona o plano de ação corretiva com determinados parâmetros como verificação da estabilidade dos reagentes e dos controles, calibrações e outras consoante ordem técnica.

4.2 Controlo de Qualidade Externo

O Controlo de Qualidade Externo consiste na participação em programas de qualidade, os resultados de certos parâmetros são avaliados por organizações de controle de qualidade externas, permite que cada laboratório verifique a precisão e exatidão das suas preparações em relação a padrões reconhecidos.

As preparações comerciais adquiridas são analisadas como amostras normais e de seguida enviadas, os resultados obtidos são comparados com o valor real da preparação e com valores de outros laboratórios participantes do mesmo programa.

Através do programa Unity Real Time é possível ter acesso em tempo real aos resultados obtidos por outros laboratórios utilizadores dos mesmos equipamentos, reagentes e controles.

Assim o laboratório consegue identificar erros e não conformidades de modo a tomar ações corretivas para conseguir apresentar resultados mais reais.

Cada setor apresenta diferentes programas de qualidade externa, em Bioquímica é utilizado o SEQC, Sociedad Española de Medicina de Laboratorio, enquanto que em Hematologia participam no NEQAS, United Kingdom National External Quality Assessment Service.

5. Imunologia Clínica

A Imunologia Clínica é uma área multidisciplinar que estuda as defesas do organismo contra agentes infecciosos e o seu papel em diversas patologias humanas, tendo como objetivo o diagnóstico, tratamento e prevenção destas.

No Laboratório Germano de Sousa, a equipa técnica utiliza essencialmente dois equipamentos: Immulite 2000 Siemens e Centaur Xp Siemens, para a deteção de marcadores tumorais e tiróideos, fármacos e hormonas da reprodução conforme o prescritor.

As amostras utilizadas são de soro e entram diretamente para a cadeia, exceto aquelas que apresentam quantidades reduzidas, tubos que pelo seu tamanho ou forma não possam entrar, amostras urgentes nomeadamente as que vem de clínicas de fertilidade ou amostras de urina. Antes de serem analisadas e imediatamente após triadas as amostras são centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos.

Quer o Immulite 2000, quer os Centaur Xp são completamente automatizados e estão ligados a cadeia, de modo a diminuir a possibilidade de erro humano, aumentam a eficiência no trabalho, e otimizam os tempos de resposta pela determinação de um maior número de parâmetros. No entanto, são equipamentos que requerem constante manutenção quer na mudança dos reagentes e diluentes, na substituição de pontas ou troca de lixos.

Ambos equipamentos utilizam quimiluminescência para a deteção do complexo antigénio-anticorpo nas amostras, tendo por base a libertação de luz visível aquando de uma reação química permitindo assim a deteção e quantificação de substâncias específicas.

O equipamento utiliza o éster de acridina como marcador de quimiluminescência por duas técnicas em imunoensaios:

1. Técnica competitiva – onde antigénios marcados com éster de acridina competem com aqueles que existem na amostra por locais de ligação, permitindo a deteção de VBI2, T3, FT3, FT4. Quanto maior a concentração do antigénio de interesse, menor o sinal gerado pelo antigénio marcado.
2. Técnica Não Competitivas – permitem a deteção de TSH, FSH, fPSA e PSA total, HIV, Ferritina, CA125, CEA e consiste na ligação de anticorpos revestidos com éster de acridina a antigénios na amostra que se pretende quantificar. Quanto maior a concentração de antigénios de interesse maior o sinal obtido. (1)

Com a minha passagem no sector de Imunologia foi-me possível integrar na equipa e realizar juntamente com os técnicos a rotina diária, particularmente a passagem de controlos e calibrações.

Todas as manhãs, após lavagens e manutenções necessárias dos equipamentos são passados os controlos fornecidos pelas casas comerciais, cada controlo pode ser específico para apenas um parâmetro (como o controlo da homocisteína) ou controlar um conjunto de diversos parâmetros.

A passagem dos controlos é diária e assegura a precisão do equipamento, no laboratório Germano de Sousa é obrigatório a utilização de dois níveis distintos e a sua verificação ocorre automaticamente pelos gráficos de Levey-Jennings, seguindo as Regras de Westgard.

Os controlos podem falhar por diversos motivos, reagentes há demasiado tempo no equipamento, controlos sem muita utilização, trocas de lotes, entre outros.

Nestes casos há sempre a abertura de um novo frasco de controlo e passagem de calibração da técnica, após exclusão de erros aleatórios

As calibrações são efetuadas quando há mudanças de lote ou periodicamente quando há necessidade por parte do equipamento. Um equipamento é também calibrado quando existem manutenções corretivas, como em avarias, e manutenções preventivas.

Muitas vezes há deteção de amostras desconhecidas, enviadas para entidades de controlo externo. Estes programas de avaliação de qualidade permitem garantir e monitorizar, a precisão e a confiabilidade dos resultados analíticos de cada laboratório.

Tabela I- Parâmetros analíticos efetuados pelo Centaur Xp e Immulite 2000

Centaur Xp				Immulinite 2000
Gentamicina	AgHBs	T4	ThCG	ACTH
Ácido Valpróico	Ac Anti-HBs	Ferritina	LH	GRH
Vancomicina	Ac Anti-HBc IgM	Insulina	Homocisteína	Gastrina
Ac Anti-VIH1/2	PSA	AFP	FSH	HPG
Ac Anti-HBe	Fpsa	CEA	Cortisol	IGF-I
AgHBe	TSH	CA199	Progesterona	TG
Ac Anti-VHA	FT4	CA153	Estradiol	DHS
Total				
Ac Anti-VHC	FT3	CA125	Prolactina	PAP
Ac Anti-HBc Total	T3	VBI2	Ácido Fólico	
Ac Anti-VHA IgM				

6. Bioquímica Clínica

A Bioquímica Clínica é das áreas mais importantes num laboratório de análises clínicas, permite quantificar componentes químicos presentes no organismo, avaliar o estado fisiológico dos utentes e identificar alterações metabólicas e possíveis doenças ou disfunções.

É a área com maior fluxo de trabalho, devido ao elevado número de parâmetros que avalia, determinam a atividade dos diferentes metabolismos do nosso organismo e são os parâmetros mais rotineiros nas áreas clínicas.

A interpretação dos dados laboratoriais requer conhecimento especializado de valores críticos, padrões de referência e possíveis variações de acordo com a idade, sexo, condições clínicas e fisiológicas dos utentes.

O Laboratório de Bioquímica da Germano de Sousa esta dividido em dois sectores, o primeiro onde se realizam os ensaios de rotina e outro, que foca nas determinações das urinas Tipo II. As urinas podem chegar em recipientes estéreis, amostras ocasionais, ou em contentores de maiores dimensões – urinas de 24 horas. São inicialmente colocadas em tubos de separação e centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos e seguem para processamento.

Assim como em Imunologia, o sector de Bioquímica é dos mais automatizados, as amostras quando triadas e após centrifugação, entram na cadeira passando primeiramente pelos equipamentos de Bioquímica. É certamente o sector mais sujeito a alterações pois o aparecimento de novos equipamentos e novas técnicas permite constantemente um grau de eficiência superior do trabalho clínico.

No Laboratório Germano de Sousa os equipamentos utilizados são o Advia Chemistry XPT 1 e 2 e analisam, através de técnicas de espectrofotometria, parâmetros de diferentes metabolismos – metabolismo dos lípidos, metabolismo ósseo e mineral, função renal, equilíbrio eletrolítico e ácido-base, função hepática e biliar, metabolismo dos hidratos de carbono, função muscular, função pancreática, diferentes proteínas, metabolismo do ferro e ainda alguns marcadores tumorais.

As amostras utilizadas são de soro, colhidas para tubos sem anticoagulante, com esferas ativadoras da coagulação e gel separador, o sangue total, após triado é centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos e entra na cadeia. O equipamento também processa amostras de plasma e urina.

O grande fluxo de trabalho na área de Bioquímica acrescenta uma preocupação no bom funcionamento dos equipamentos, de modo, que a passagem de todas as calibrações e

controles tem que ser garantida para que os resultados dos inúmeros parâmetros sejam coerentes uns com os outros, fidedignos e incontestáveis.

Em Bioquímica acompanhei toda rotina técnica desde o funcionamento e manutenção dos equipamentos, passando pela preparação de reagentes e reconstituição de calibradores/controles até à validação e interpretação de resultados.

Comparativamente ao sector de Imunologia, em Bioquímica os controles também são fornecidos pelas casas comerciais e apesar de existirem três níveis de controlo são utilizados dois consoante os dias, de acordo com o Plano de Controlo de Qualidade Interno definido.

Para além de Controlo de Qualidade Interno, o Laboratório Germano de Sousa participa também num programa de Controlo de Qualidade Externo da SEQC com periodicidade mensal.

Metabolismo dos Glúcidos	Glicose
Metabolismo Proteico	Albumina Complemento C3 e C4 Proteínas Séricas Totais Proteínas Urinarias
Metabolismo Mineral e Ósseo	Cálcio Total Magnésio
Metabolismo Lipídico	Colesterol Triglicerídeos Colesterol LDH/HDL
Metabolismo do Ferro	Transferrina Ferro
Função renal	Ureia Creatinina Acido Úrico Microalbuminúria
Função Hepática	AST ALT Bilirrubina Direta Bilirrubina Indireta
Função Pancreática	Amilase
Função Cardíaca	LDH
Eletrólitos	Sódio Potássio Cloreto

7. Hematologia Clínica

Hematologia Clínica concentra-se na interpretação de amostras de sangue e outros líquidos, avalia e estuda doenças sanguíneas e dos órgãos hematopoéticos detetando as suas causas, prognósticos, tratamentos e prevenção.

A análise do plasma permite o estudo do processo de hemóstase, avaliando assim alterações nos processos de coagulação e monitorizando a terapêutica de doentes hipocoagulados.

Análises hematológicas como hemograma, leucograma ou velocidades de sedimentação são testes bastante comuns realizados em laboratórios clínicos sendo uma área bastante movimentada.

7.1 Equipamentos e Metodologias

No laboratório Germano de Sousa, o setor de Hematologia dispõe de vários equipamentos automatizados, o Sysmex XN-9100, o Sysmex CS-5100 e o DIESSE Ves-Matic Cube 30 Touch.



Figura 1 – Representação Sysmex XN-9100-401

O Sysmex XN-9100-401 é um sistema automatizado de hematologia constituído por seis analisadores hematológicos e um preparador e corador de lâminas que permite a realização e visualização de esfregaços sanguíneos completamente automatizado.

O equipamento consegue realizar até 400 hemogramas/hora e 75 esfregaços/hora revelando-se

extremamente eficiente.

Possui três princípios de análises consoante os parâmetros selecionados.

Para a contagem diferencial leucocitária, contagem de granulócitos imaturos, reticulócitos e fração imatura destes, eritrócitos nucleados, fração imatura das plaquetas e contagem de plaquetas fluorescentes utiliza **Citometria de Fluxo**.

A Citometria de Fluxo é uma técnica que permite uma análise física e química das células sanguíneas e a sua quantificação. A medida que as células passam individualmente por um feixe de luz de um equipamento medidor – citómetro – são distinguidas e quantificadas.

A amostra de sangue é primeiro diluída com fatores pré-determinados e depois conjugada com marcadores fluorescentes que se ligam de forma específica aos ácidos nucleicos de cada partícula. Uma luz semicondutora vai propagar-se pela amostra que através da dispersão frontal de luz, da dispersão lateral e da fluorescência lateral vão separa-la consoante o volume celular, conteúdo celular e quantidade de DNA/RNA respetivamente. (2)

A contagem de eritroblastos, do hematócrito e contagem de plaquetas é feita por **impedância com foco hidrodinâmico**.

Esta técnica mede as alterações de uma corrente elétrica aquando da passagem de células sanguíneas por um orifício situado entre dois elétrodos. As células sanguíneas não são condutoras de corrente elétrica logo a sua passagem individual pela abertura vai causar uma diferença de potencial entre os dois elétrodos e essa alteração na corrente gera um pulso elétrico proporcional ao volume da célula que acabou de passar. (3)

Já a hemoglobina é quantificada pelo **método de sulfato lauril de sódio livre de cianeto** onde o reagente vai hemolisar os eritrócitos, esta reação leva a alteração da hemoglobina que oxida o grupo heme. O grupo hidrofílico do sulfato lauril de sódio vai ligar-se ao grupo heme, anteriormente oxidado, e forma um complexo corado. O equipamento tem uma luz LED que emite luz monocromática e ao passar pelo complexo sulfato lauril de sódio-heme vai ser absorvida. A concentração de hemoglobina na amostra vai ser proporcional a absorção. (4)

Para um correto funcionamento e segurança dos resultados emitidos o Sysmex XN-9100 deve estar calibrado e diariamente executar os controlos necessários.

No laboratório Germano de Sousa, todos os dias, ao início do trabalho passam-se os controlos de três níveis diferentes (alto, baixo e normal) fornecidos pela casa comercial e um replicado, uma amostra de sangue de um utente com valores anteriormente avaliados e conhecidos, que testa a fidelidade e verifica o coeficiente de variação das amostras.

Também o Plano de Qualidade Externo é executado no âmbito do programa internacional NEQAS (External Quality Assessment Services) que avalia parâmetros como a contagem celular do sangue, contagem de reticulócitos, hemoglobinopatias e morfologia do sangue periférico.

O equipamento Sysmex CS-5100 analisa a coagulação e é totalmente automatizado, ligado a um computador, é utilizado para diagnóstico *in vitro*, com um nível elevado de exatidão e um rendimento de cerca de 400 testes/hora. (5)



Figura 2 – Representação Sysmex CS-5100

O equipamento só processa amostras de sangue total em citrato de sódio, após centrifugação a 3000 rpm durante 15 minutos, amostras ictéricas lipémicas ou hemolizadas afetam normalmente a leitura dos ensaios de coagulação principalmente métodos óticos, como é o caso.

Utiliza o princípio do foto-ótico contínuo, sequencial com base nas alterações da luz transmitida-emitida após adição dos reagentes.

Opera com uma tecnologia multi-comprimento de onda para a coagulação, com cerca de 20 canais individuais para métodos cromogénicos, de imunoensaio e de agregação. (5)

O Plano de Qualidade Externo é executado pelo programa do Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge (INSA) avaliando parâmetros como Tempo de Protrombina e INR, aPTT, fibrinogénio, entre outros.

Por fim, o Ves-Matic Cube 30 Touch, é um equipamento automática que analisa velocidades de sedimentação de amostras de sangue.

Os resultados obtidos após 20 minutos de trabalho são comparados com os de um método de referência, o método de Westergreen.

O método de Westergreen é manual, no entanto ainda muito utilizado no Laboratório Germano de Sousa principalmente para amostras com pouca quantidade que não conseguem ser aspiradas pelo VS Cube.

Numa amostra de sangue com EDTA é introduzido o tubo de Westergreen que cria vácuo, e permite que o sangue fique posicionado sobre ele verticalmente durante aproximadamente 1 hora.

Após esse tempo realiza-se a leitura entre o menisco do plasma e o nível da coluna dos eritrócitos que sedimentaram, o resultado é expresso em milímetros.



Figura 3 – Representação Ves-Matic Cube 30 Touch

O equipamento determina as VSE de cerca de 30 amostra, aspirando inicialmente a amostra para ser centrifugada, seguidamente um foto detetor capta impulsos elétricos por unidade de tempo que são diretamente proporcionais a concentração dos eritrócitos aspirados.

A leitura é feita por fotometria de infravermelhos a um comprimento de onda de 950nm.

Para cada amostra é obtida uma curva de sedimentação e os valores são posteriormente comparados com o método de referência. (6)

O VS Cube também apresenta programas de controlo de qualidade interna, que controlam a eficácia do sensor ótico e são realizados diariamente para avaliara a exatidão e precisão de todos os resultados.

7.2 Hematopoiese

Hematopoiese é o mecanismo de formação, desenvolvimento e maturação de todas as células sanguíneas, eritrócitos, leucócitos ou plaquetas, a partir de um único precursor celular comum e indiferenciado – a célula hematopoiética pluripotente. Estas células são produzidas pela medula óssea e são as responsáveis pela formação de todos os elementos figurativos do sangue e dos seus derivados. (7,12)

A hematopoiese ocorre em diferentes locais durante o ciclo de vida do ser humano, no saco vitelino nas primeiras semanas de gestação, seguido do fígado, baço e placenta até aos sete meses. Após esse período a hematopoiese ocorre na medula óssea até ao final da vida do ser humano, sendo a MO o maior órgão hematopoético e maioritariamente responsável pela libertação de todas as células sanguíneas para a corrente. (7,12)

A medula permite a ancoragem de vários elementos essenciais a hematopoiese como células estaminais hematopoiéticas, os fatores que controlam a sua proliferação, diferenciação e maturação, fatores de crescimento e citocinas.

Todas as células que fazem parte do sistema hematopoiético são altamente especializadas com funções extremamente cruciais no organismo desde o transporte de oxigénio, a manutenção da homeostase ou a defesa imunitária.

O início da hematopoiese ocorre com uma célula estaminal pluripotente que pode autorrenovar-se ou, através do processo de diferenciação, ser o precursor para outras linhagens de células sanguíneas. (7,12)

As células progenitoras mieloides originam diferentes linhagens como a eritróide, a monocítica, a granulocítica e a megacariocítica enquanto que as células progenitoras da linha linfóide vão dar origem as células T e B, as células Natural Killer e as células dendríticas.

Este processo de proliferação e diferenciação é controlado por fatores de crescimento, glicoproteínas que previnem erros na diferenciação e evitam a ocorrência de patologias.

Consoante o fator de crescimento estimulado determinam-se se a célula estaminal é diferenciada numa célula da linha mielóide ou da linha linfóide. (7)

A eritropoietina e a trombopoietina são exemplos destes fatores, a primeira controla a diferenciação de glóbulos vermelhos e a trombopoietina estimula a produção de plaquetas.

As diferentes células da linha linfóide têm também citocinas específicas que aumentam a sua proliferação como o fator de crescimento dos granulócitos.

A célula precursora mielóide vai maturar na medula óssea e daí, consoante os múltiplos fatores de crescimento, diferenciar-se nas diferentes células constituintes do sangue como o mastócito, o mieloblasto, proeritroblasto e o megacarioblasto, após diversas diferenciações e maturações dão origem aos basófilos, neutrófilos, eosinófilos, monócitos, eritrócitos e plaquetas.

A célula indiferenciada linfóide vai igualmente e consoante os fatores de crescimento dar origem a células dendríticas ou linfoblastos que por sua vez originam linfócitos B e NK que sofrem o processo de maturação na medula óssea enquanto que os linfócitos T migram para o timo onde maturam. (7,12)

O processo da hematopoiese permite assim a diferenciação e constante renovação das células sanguíneas. Indivíduos saudáveis só apresentam na circulação células que consigam concluir a diferenciação e maturação sanguínea.

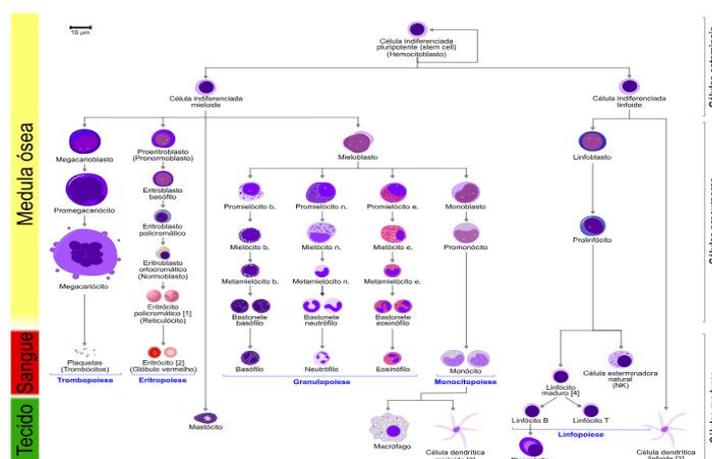


Figura 4 – Processo da Hematopoiese

7.3 Hemograma

O hemograma é dos exames mais requisitados na área clínica, permite avaliar as diferentes células sanguíneas, diagnosticar e monitorizar algumas patologias e infeções e fornece ainda uma informação geral da saúde do utente.

O hemograma é composto pela contagem de diversos parâmetros como glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas, quantificação de hemoglobina presente nos eritrócitos e o hematócrito. Além destas informações fornece a quantificação dos diferentes linfócitos - neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, basófilos e monócitos. (8,11)

No Laboratório Germano de Sousa o equipamento utilizado para análise destes parâmetros incluindo esfregaço sanguíneo é o Sysmex XN-9100 como referido anteriormente.

7.3.1 Eritrograma

O eritrograma é o teste analítico que permite avaliar diversos aspetos relacionados com as células vermelhas do sangue. Fornece informações importantes que auxiliam na identificação de anomalias dos eritrócitos como anemias, alterações morfológicas e poliglobulia através de dados sobre a forma, tamanho, quantidade e concentração de hemoglobina. (7,10)

O hemograma apesar de ter grande importância clínica deve ser interpretado por profissionais de saúde, tendo em consideração os dados clínicos do utente.

O eritrograma avalia os seguintes parâmetros:

- Eritrócitos

Os eritrócitos, são pequenas células sem núcleo, discoides com uma forma achatada no centro que permite realizar trocas gasosas com facilidade.

Devido a presença de hemoglobina, são as principais células responsáveis pelo transporte de oxigénio dos pulmões para os restantes órgãos, e do transporte de dióxido de carbono do organismo para a eliminação nos pulmões. Tem um tamanho de cerca de 8.0 μm e uma vida média útil de 120 dias e são eliminados pelo fígado e baço.

O eritrograma provém a sua contagem expressa em número de células por litro, este parâmetro varia consoante o sexo, os homens apresentam valores mais elevados que rondam

os 4,7 a 6,1 enquanto que nas mulheres, os valores de referência estão compreendidos entre os 4,2 e os 5,4 milhões de eritrócitos por microlitro de sangue.

- Hemoglobina (Hb)

A hemoglobina é uma proteína presente nos eritrócitos e que permite as trocas gasosas.

É um parâmetro que avalia anemias, diagnostica e monitoriza distúrbios hematológicos como talassemias ou deficiências por Vitamina B12 e ácido fólico. Hb avalia também a resposta aos tratamentos de várias patologias hematológicas.

A sua concentração é expressa em grama por decilitro de sangue (g/dL), e os valores de referência são variáveis consoante fatores como o sexo, a idade, a altitude e outras condições específicas de saúde dos utentes. Para homens os valores de referência estão compreendidos entre os 13.0 g/dL e 17.0 g/dL e para mulheres diminuem para 12.0 g/dL e 15.0 g/dL.

- Hematócrito (Ht)

O hematócrito representa a percentagem do volume total de sangue que é ocupada por eritrócitos e é expressa em percentagem relativa do volume de eritrócitos (%).

É um parâmetro bastante útil para a avaliação de anemias, policitemias e para monitorização de patologias como desidratações, doenças renais ou distúrbios da medula óssea.

Deve ser sempre interpretado juntamente com outros parâmetros hematológicos e varia com o sexo, idade e a altitude. Os valores de referência para homens estão situados entre os 40% e os 50% e para mulheres entre os 36% e os 46%.

- Índices Hemateméticos

São parâmetros adicionais calculados com base nos resultados do hemograma, como a contagem de eritrócitos, os valores da hemoglobina e do hematócrito. Fornecem informações complementar sobre as características dos eritrócitos e permitem o diagnóstico e classificação dos diferentes tipos de anemia. (7,10)

Volume Corpuscular Médio (VCM)

VCM é um parâmetro que avalia o tamanho médio dos eritrócitos, expresso em femtolitros (fL). Os valores de referência rondam os 80.0 fL e os 97.0 fL. VCM permitem classificar as anemias com base no tamanho dos eritrócitos em microcíticas, normocíticas e macrocíticas.

É calculada a partir da seguinte fórmula:

$$VCM = \frac{\text{Hematócrito (\%)} \times 10}{\text{Contagem de eritrócitos} (\times 10^{12}/L)} fL$$

Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)

HCM é um parâmetro que avalia a quantidade média de hemoglobina presente nos eritrócitos e é expressa em picogramas (pg). Os valores de referência variam entre 27.0 pg e os 32.0 pg. Esta média permite classificar as anemias em hipocrômicas ou normocrômicas.

É calculada a partir da seguinte fórmula:

$$HCM = \frac{\text{Hemoglobina (g/dL)}}{\text{Contagem de eritrócitos} (\times 10^{12}/L)} \times 10 \text{ pg}$$

Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)

CHCM é um parâmetro que avalia a concentração média de hemoglobina presente nos eritrócitos e é expressa em g/dL. Os valores de referência variam entre 32.0 g/dL e 36.0 g/dL. Esta média permite classificar as anemias em normocrômicas, hipocrômicas ou hiperocrômicas. É calculada a partir da seguinte fórmula:

$$CHCM = \frac{\text{Hemoglobina (g/dL)}}{\text{Hematócrito(\%)}} \times 100 \text{ g/dL}$$

Coefficiente de Dispersão Eritrocitária (RDW)

RDW indica o coeficiente de variação na distribuição do volume eritrocitário, é expresso em percentagem (%). Este parâmetro é um indicativo do índice de anisocitose e fornece informações sobre a forma e o tamanho dos eritrócitos. Os valores de referência estão situados entre os 11,6% e os 14,0%.

7.3.1.1 Alterações Qualitativas e Quantitativas do Eritrograma

Alterações qualitativas

O esfregaço sanguíneo é um procedimento laboratorial complementar ao hemograma e que permite observar as células sanguíneas em microscopia, deteta alterações no tamanho, coloração, morfologia e outras características que de outro modo não seria possível.

No Laboratório Germano de Sousa todo o processo da preparação de um esfregaço, desde o espalhamento do sangue na lâmina até a fixação e coloração é executado automaticamente pelo Sysmex XN-9100, facilitando o trabalho dos técnicos e assegurando resultados mais confiáveis pela redução da probabilidade de erro humano.

Tamanho

Os eritrócitos podem ser classificados quanto a média do tamanho do seu diâmetro pelo Índice de Anisocitose (RDW) visto anteriormente. O VCM é também um parâmetro que aumenta e decresce consoante o aumento ou a diminuição do diâmetro dos eritrócitos respetivamente.

Um eritrócito com um diâmetro médio de 8,0 μm é um eritrócito normocítico, no entanto células com tamanho inferior ao normal (inferior 6,2 μm) são classificadas como eritrócitos microcíticos enquanto que células com um tamanho superior ao normal (superior a 8,2 μm) são consideradas eritrócitos macrocíticos. (10,11)

A microcitose ocorre em anemia sideroblásticas, anemias por deficiência de ferro e anemias de doenças crónicas, e a macrocitose ocorre quando existem anemias megaloblástica, anemia por deficiência de vitamina B12 e ácido fólico ou em doenças hepáticas. (7,8,10,11)

Coloração

Os eritrócitos apresentam uma coloração rosa pálida a avermelhada e um núcleo mais pálido que o dos leucócitos, estes eritrócitos designam-se normocrômicos.

Um eritrócito excessivamente pálido pode estar associado a talassemias, anemias de doenças crônicas e anemias por deficiência de ferro e são designados de eritrócitos hipocrômicos. Eritrócitos hiperocrômicos, eritrócitos excessivamente avermelhados, são muitas vezes consequência de macrocitoses e esferocitoses. (7,10,11)

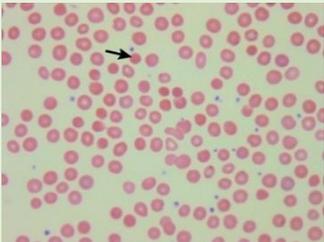
O parâmetro CHCM varia diretamente com o aumento ou diminuição da coloração dos eritrócitos. (7,8,10,11)

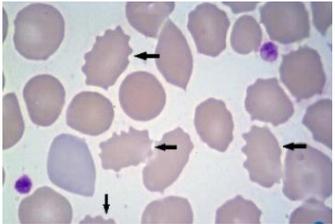
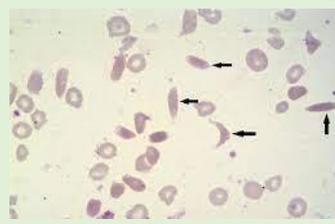
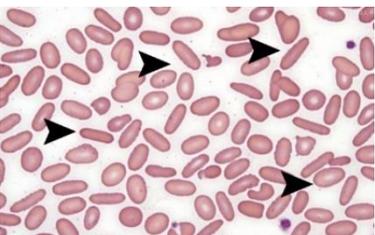
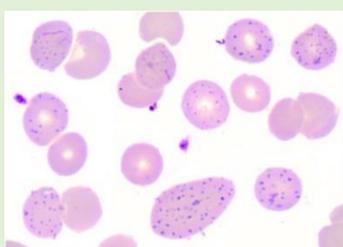
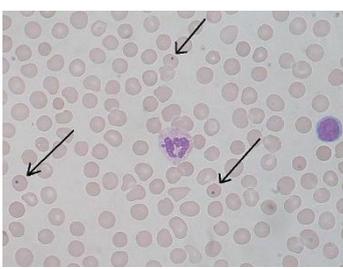
Morfologia

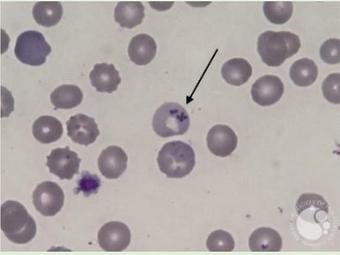
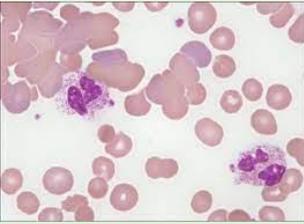
Um eritrócito é geralmente descrito como uma célula discoide bicôncava com uma depressão central em ambos os lados, no entanto há inúmeros relatos de alterações na morfologia destes. Durante o esfregaço sanguíneo além de alterações na morfologia dos eritrócitos podemos encontrar inclusões eritrocitárias, parasitas ou estruturas com partículas de ferro ou ácidos nucleicos. Microscopicamente também é possível identificar alterações na distribuição dos eritrócitos sendo por aglutinação ou por Rouleaux. (11,12)

Na tabela seguinte encontram-se representadas as alterações anteriormente mencionadas:

Tabela 3 – Alterações morfológicas de eritrócitos (11,12)

Morfologia/Alterações	Informações Adicionais	Patologias Associadas
<p>Esferocitose</p>  <p>Figura 5 – Esferocitose</p>	<p>Eritrócitos pequenos de forma esférica, sem membrana celular.</p>	<p>Anemia Hemolítica Autoimune Esferocitose Hereditária Queimaduras Extensas</p>

<p>Acantocitose</p>  <p><i>Figura 6 – Acantocitose</i></p>	<p>Eritrócito com múltiplas projeções espiculadas de vários comprimentos e Irregulares.</p>	<p>Anemia Hemolítica Abetalipoproteinémia Hereditária Insuficiência Renal Doença hepática</p>
<p>Drepanocitose</p>  <p><i>Figura 7 – Drepanocitose</i></p>	<p>Eritrócitos em forma de foice, alongados e curvos com duas pontas pontiagudas.</p>	<p>Anemia Falciforme</p>
<p>Eliptocitose/Ovalocitose</p>  <p><i>Figura 8 – Eliptocitose/Ovalocitose</i></p>	<p>Eritrócitos em forma de cigarro e de ovo respectivamente.</p>	<p>Eliptocitose/ Ovalocitose Hereditárias Anemia por Deficiência de Ferro Anemia Megaloblástica Talassemias</p>
<p>Ponteado Basófilo</p>  <p><i>Figura 9 – Ponteado Basófilo</i></p>	<p>Pequenas inclusões basófilas compostas por agregados ribossomais com RNA precipitado.</p>	<p>Talassemias Envenenamento por materiais pesados Doença Hepática Anemia Megaloblástica Anemia Hemolítica Síndrome Mielodisplásica</p>
<p>Corpos de Howell- Jolly</p>  <p><i>Figura 10 – Corpos de Howell-Jolly</i></p>	<p>Inclusões citoplasmáticas formadas por fragmentos nucleares (DNA).</p>	<p>Anemia Megaloblástica Anemia Hemolítica Grave Talassemia Major Anemia Falciforme Síndrome Mielodisplásica Hipoesplenismo</p>

<p style="text-align: center;">Corpos de Pappenheimer</p>  <p style="text-align: center;"><i>Figura 11 – Corpos de Pappenheimer</i></p>	<p>Inclusões basófilas compostas por partículas de ferros, os eritrócitos que as apresentam são denominados de siderócitos.</p>	<p>Anemia Sideroblásticas Anemias Hemolíticas Talassemias Anemia megaloblástica</p>
<p style="text-align: center;">Rouleaux</p>  <p style="text-align: center;"><i>Figura 12 – Rouleaux</i></p>	<p>Eritrócitos empilhados como pilhas de moedas na parte fina da extensão.</p>	<p>Mieloma Múltiplo Estados Inflamatórios e Infeciosos Gravidez</p>
<p style="text-align: center;">Aglutinação</p>  <p style="text-align: center;"><i>Figura 13 – Aglutinação</i></p>	<p>Aglomerados irregulares resultantes da presença de um autoanticorpo frio.</p>	<p>Anemia Hemolítica Anemia Autoimune, Paraproteinemias</p>

Alterações quantitativas

Os diversos parâmetros do eritrograma permitem avaliar as alterações quantitativas da amostra, como anemias ou contrariamente policitemias.

Por definição, anemia é uma condição clínica onde há uma diminuição na quantidade de hemoglobina presente nos eritrócitos.

Considera-se um homem com anemia quando o valor da sua hemoglobina é inferior a 13.0 g/dL e na mulher o valor de Hb é inferior a 12.0 g/dL.

Índices como VCM, HCM e CHCM permitem classificar as anemias conforme certos parâmetros.

VCM classifica as anemias em microcíticas, normocíticas e macrocíticas.

As anemias microcíticas caracterizam-se por um VGM inferior a 80.0 fL e estão geralmente associadas a deficiências de ferro, talassemias, anemias sideroblásticas e anemia das doenças

crônicas, enquanto que as macrocíticas apresentam um VCM superior a 100.0 fL e são associadas a anemias aplásticas ou anemias com deficiência de vitamina B12 e ácido fólico. (10,11)

O parâmetro HCM auxilia na diferenciação das anemias hipocrômicas (valores inferiores a 25.0 pg) associadas a deficiência de ferro, anemias hereditárias e anemias normocrômicas que normalmente são causadas por doenças secundárias.

CHCM é um índice que classifica também as anemias em normocrômicas, hipocrômicas ou hiperocrômicas. As anemias normocrômicas, tem valores próximos dos valores de referência e estão associadas a anemias hemolíticas. Já as anemias hipocrômicas apresentam um valor de CHCM inferiores a 30.0 g/dL e ocorrem em anemias por deficiência de ferro e doenças crônicas, as hiperocrômicas apresentam um CHCM superior a 36.0 g/dL e são anemias provenientes de esferocitose hereditária, hemocromatose e talassemias. (7,10,11)

A condição oposta a anemia é uma policitemia que é caracterizada por um aumento da viscosidade do sangue.

A policitemia um distúrbio hematológico que leva ao aumento anormal de células sanguíneas, em especial de eritrócitos, pode ser primária como é o caso da policitemia vera, ou uma condição secundária resultante de doenças pulmonares, cardíacas ou desidratação. (11)

7.3.2 Leucograma

O leucograma é um exame laboratorial que permite avaliar a contagem e percentagem dos cinco tipos de leucócitos e a sua distribuição no sangue. É uma ferramenta essencial no diagnóstico e na monitorização de diversas patologias e condições como infeções, doenças inflamatórias, leucemias, entre outras.

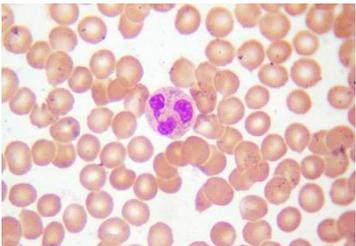
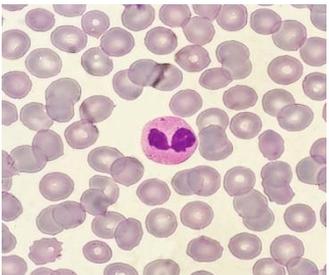
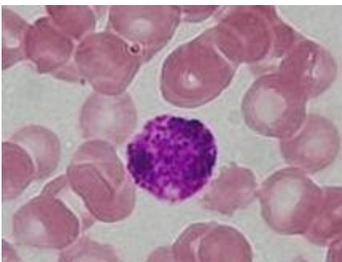
Os leucócitos são células muito maiores e complexas que os eritrócitos, no organismo fazem parte da defesa contra substâncias estranhas e são diferenciados consoante o seu tamanho, cor e forma.

Morfologicamente podemos distinguir duas populações diferentes, os polimorfonucleares/granulócitos – neutrófilos, basófilos e eosinófilos – e os mononucleares – monócitos e linfócitos.

Os granulócitos contém grânulos citoplasmáticos no seu interior e os mononucleares possuem apenas um núcleo oval que podem até conter grânulos mas não perceptíveis. (12,9)

Na tabela seguinte encontram-se representadas os cinco tipos de leucócitos presentes no sangue e algumas das suas características:

Tabela 4 – Cinco tipos de leucócitos e características (7,12)

Células	Características
<p style="text-align: center;">Neutrófilo</p>  <p style="text-align: center;"><i>Figura 14 – Neutrófilos</i></p>	<p>Leucócitos mais abundantes na corrente sanguínea. Apresentam um núcleo multilobulado entre dois a cinco lobos conectados por filamentos de cromatina densa.</p> <p>Apresentam grânulos citoplasmáticos e apresentam uma vida útil bastante curta.</p> <p>Tem um papel fundamental contra as defesas do sistema imunológico uma vez que tem atividade fagocítica.</p>
<p style="text-align: center;">Eosinófilo</p>  <p style="text-align: center;"><i>Figura 15 – Eosinófilos</i></p>	<p>Apresentam dois lóbulos no núcleo conectados por uma ponte e cromatina, tem grânulos citoplasmáticos esféricos no seu interior distribuídos de forma uniforme. Desempenham um papel na defesa contra infecções parasitárias e libertam histamina aquando de reações alérgicas. Atuam na resposta imunológica e tem uma vida útil prolongada.</p>
<p style="text-align: center;">Basófilo</p>  <p style="text-align: center;"><i>Figura 16 – Basófilo</i></p>	<p>Apresentam um núcleo irregular, lobulado que dependentemente da maturação pode variar. Contém grânulos citoplasmáticos grossos, redondos ou angulares que muitas vezes se sobrepõem ao núcleo. Participam na fase inicial dos processos inflamatórios e tal como os eosinófilos estão envolvidos nas reações alérgicas.</p>

Linfócito

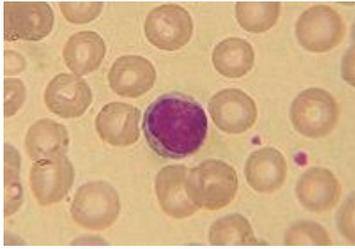


Figura 17 – Linfócito

Monócito

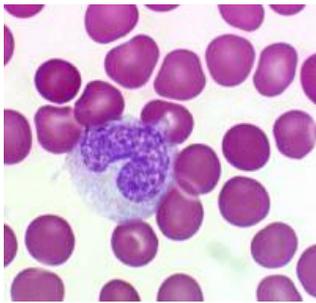


Figura 18 – Monócito

Células com um núcleo grande, arredondado e condensado que ocupa a maior parte da célula, tem uma aparência homogênea e não apresentam segmentação.

Contém poucos grânulos que não são indistinguíveis. Desempenham um papel na resposta imune adaptativa e desenvolvem memória imunológica.

Apresentam um núcleo grande e oval localizado na área central da célula.

O citoplasma é abundante, mas não inclui grânulos.

Apresenta vacúolos.

Tem capacidade fagocítica sendo os precursores dos macrófagos

7.3.2.1 Alterações Qualitativas e Quantitativas do Leucograma

Alterações qualitativas

As células da linha branca também apresentam em certas condições alterações na morfologia e características diferenciadas nos leucócitos presentes no esfregaço sanguíneo. (7,12)

A **presença de células imaturas** como blastos no sangue periférico pode indicar uma produção anormal de células sanguíneas por parte da medula óssea. A presença de linfoblastos é também associada ao aparecimento de Leucemia Linfocítica Aguda.

Atipias linfocíticas são alterações na forma, tamanho ou aparência dos linfócitos, estão associadas normalmente a infecções virais ou doenças linfoproliferativas. São células maiores que o normal com um intensa basofilia no citoplasma.

Toxicidade dos neutrófilos, ocorre pela alteração nas características e na aparência dos neutrófilos, como o aumento do núcleo, a cromatina dispersa, grânulos citoplasmáticos mais densos e existência de corpúsculos de Döhle – manchas azuis-clara no citoplasma.

A toxicidade das células é resposta a condições inflamatórias graves.

Neutrófilos hipersegmentados com cerca de seis ou mais lóbulos são característica de anemias megaloblásticas e com pouca frequência pode aparecer em anemias com deficiência de ferro.

Alterações quantitativas

O leucograma apresenta alterações nos valores absolutos e nas proporções dos diferentes tipos de célula. Estas alterações podem dever-se a fatores como idade, condições físicas e clínicas como gravidez ou tabagismo.

A **leucopenia** caracteriza-se por uma diminuição do número total de todos os leucócitos no sangue e pode estar associada a diversas condições como infeções virais, doenças autoimunes, efeitos de medicamentos ou quimioterapia. (7,12)

A **leucocitose**, pelo contrário, é caracterizada por um aumento do número total dos linfócitos no sangue e deve-se igualmente a várias condições como infeções bacterianas, reações alérgicas, resposta a traumas, entre outras. (7,12)

7.3.3. Trombocitograma

O trombocitograma é a parte representativa das plaquetas, avalia a sua morfologia e realiza uma contagem absoluta destas células no sangue periférico. Esta análise laboratorial fornece informações importantes sobre o comportamento e a função das plaquetas nomeadamente na coagulação sanguínea.

As plaquetas, ou trombócitos são pequenas partículas, discoides e sem núcleo verdadeiro inclui apenas fragmentos citoplasmáticos que circulam na corrente na sua forma inativa.

Apresentam um papel crucial em todo o processo da coagulação, participam na hemóstase primária e secundária e no mecanismo de trombose. (7,12)

O trombocitograma avalia parâmetros como:

- Contagem de plaquetas, corresponde ao número total de trombócitos que varia entre as 150.00 e 400.000 expresso em unidades/ μ l.
- Volume Plaquetário Médio (VPM), fornece informações sobre a variação do tamanho das plaquetas.
- Amplitude de Distribuição Plaquetária (ADP), indica o nível e heterogeneidade dos trombócitos.

7.3.3.1 Alterações Qualitativas e Quantitativas do Trombocitograma

Alterações qualitativas

O trombocitograma pode apresentar alterações na morfologia e na aparência das plaquetas. As plaquetas gigantes, são células com diâmetro quatro vezes superior ao de uma plaqueta normal e pode estar associada a distúrbios da medula óssea, doenças mieloproliferativas e macrotrombocitopenias hereditárias.

Microplaquetas são plaquetas de menor dimensão que também podem ser encontradas na corrente sanguínea associadas a problemas na produção de plaquetas ou na sua destruição. Pode ocorrer também o oposto, macroplaquetas que, apesar de não chegarem ao tamanho das plaquetas gigantes, são relativamente maiores que as normais e o seu aparecimento ocorre por resposta compensatórias à diminuição das plaquetas na corrente circulante. (7,12,14)

Podemos encontrar ainda satelitismo e agregados plaquetares.

O satelitismo ocorre quando as plaquetas se agregam umas as outras criando conglomerados que aderem a outras células como leucócitos, em estruturas parecidas a satélites. São estruturas observadas normalmente em doenças inflamatórias, infecciosas ou imunológicas, é um sinal de ativação plaquetária aumentada ou anormalidades da função das plaquetas.

Os agregados plaquetares são formações que resultam da aderência de diversas plaquetas entre si. No sangue circulam individualmente, no entanto nestas situações acabam por se unir e formar agregados plaquetares. Ocorrem frequentemente pela consequência de processos inflamatórios, doenças vasculares como a aterosclerose onde há agregação de plaquetas e obstrução de vasos sanguíneos. (7,12,14)

Alterações quantitativas

A hemostasia sanguínea é assegurada pelo bom funcionamento das plaquetas e quando existe aumento ou decréscimo da quantidade todo o processo é alterado. A avaliação e compreensão das alterações quantitativas das plaquetas é fundamental para evitar eventos hemorrágicos graves ou trombóticos.

Trombocitose é uma condição clínica que se caracteriza pelo aumento anormal do número de plaquetas na corrente sanguínea, superior a 450 000/ μ l. Pode ser assintomática ou causar episódios hemorrágicos graves e formação de trombócitos.

Existem dois tipos de trombocitose:

- Trombocitose reativa que ocorre como resposta a outras condições clínicas, como cirurgias e infeções. É a causa mais frequente de trombocitose uma vez que surge como uma resposta adaptativa do organismo.
- Trombocitose essencial é um distúrbio mieloproliferativo crónico caracterizado pela produção descontrolada de uma célula estaminal hematopoiética pluripotente que conduz posteriormente a um aumento de plaquetas na corrente sanguínea. É uma condição menos comum e quando ocorre afeta pessoas com mais idade. (12,14)

A **Trombocitopenia** caracteriza-se pela diminuição na contagem de plaquetas na corrente sanguínea, é diagnosticada quando o número de plaquetas é geralmente inferior a 150 000/ μ l. É fundamental uma monitorização desta condição uma vez que o estado clínico do doente depende da causa e da gravidade desta situação. Em casos mais graves pode ser necessário transfusões de plaquetas. As causas prováveis de uma trombocitopenia são:

- Diminuição da sua produção, pode ocorrer por alterações no funcionamento da medula óssea como aplasias ou efeito secundário de certos medicamentos.
- Aumento da destruição das plaquetas, ocorre frequentemente em doenças autoimunes como em púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) ou lúpus eritematoso sistêmico.
- Diluição de plaquetas após diversas transfusões sanguíneas ou ingestão aumentada de líquidos intravenosos.
- Consumo acelerado de plaquetas em caso de hemorragias intensas, cirurgias ou síndromes hemolíticas-urémicas. (12,14)

7.4 Contagem de Reticulócitos

A contagem de reticulócitos como parâmetro hematológico é fundamental para uma interpretação da produção de eritrócitos pela medula óssea e para distinguir anemias de causa medular de anemias extra-medulares.

Os reticulócitos são células imaturas dos glóbulos vermelhos que possuem ainda restos de material genético (RNA) no citoplasma derivados dos percursos nucleados.

Compõem cerca de 0,5% a 2,5% do total de eritrócitos no sangue periférico, quando de um aumento ou diminuição da produção de eritrócitos por parte da medula óssea, os valores deste parâmetro aumentam ou decrescem respectivamente, permitindo assim avaliar o grau de resposta da medula.

Um aumento de reticulócitos no sangue periférico pode indicar anemias hemolíticas e uma eritropoiese aumentada para compensar esta situação. No entanto, diminuição no número de reticulócitos está associado a anemias ferroprivas ou anemias megaloblásticas. (8,11)

7.5 Velocidade de Sedimentação Eritrocitária

A velocidade de sedimentação eritrocitária (VSE) ou taxa de sedimentação de eritrócitos é um parâmetro que mede a distância percorrida pelos glóbulos vermelhos no plasma autólogo anti coagulado durante um determinado período de tempo.

Em condições normais, os eritrócitos tendem a replicar-se devido as cargas elétricas negativas resultantes dos resíduos de ácido siálico existente nas glicoproteínas das membranas. A composição do plasma acaba por se modificar devido a produção de proteínas de “fase aguda” do fígado que ocorre em processos inflamatórios ou danos tecidulares, estas proteínas ligam-se aos eritrócitos alterando a carga negativa do potencial de membrana que permite que os eritrócitos se liguem uns aos outros em Rouleaux acabando por sedimentar quando a sua densidade supera a do plasma. (15)

O VSE é deste modo uma medida inespecífica de estados inflamatórios do organismo como ocorre em infeções, aumento de globulinas, em síndromes nefróticas ou quando de necroses tecidulares como enfartes do miocárdio.

É um parâmetro variável consoante a idade e o género, idades avançadas e mulheres apresentam valores de VSE mais elevados. Em mulheres, o valor da VSE está compreendido

entre 1.0 mm e 15.0 mm e nos homens entre 1.0 mm e 10.0 mm, aumenta também durante a gravidez.

7.6 Hemóstase

A hemóstase é um processo fisiológico que permite ao organismo prevenir ou interromper uma hemorragia. É um sistema extremamente complexo que envolve diversas etapas e diversos contribuintes como plaquetas, fatores de coagulação e proteínas plasmáticas, tem como objetivo manter o equilíbrio entre a formação de coágulos e a sua dissolução após lesão dos vasos sanguíneos.

É composta essencialmente por duas etapas:

- Hemóstase primária – acontece imediatamente após uma lesão vascular, controla o sangramento e forma o tampão plaquetário. Ocorre primeiramente vasoconstrição por parte das células musculares lisas após ativação das plaquetas que se agregam e formam um tampão plaquetário, seguidamente há ativação dos fatores de coagulação que formam uma rede de fibrina e posteriormente um coágulo.
- Hemóstase secundária – é um processo de longa duração que estabiliza e consolida o coágulo sanguíneo, há ativação da cascata de coagulação, por via intrínseca ou extrínseca, formação da trombina que converte fibrinogénio em fibrina que retarda o coágulo. A última etapa é a fibrinólise que é o processo pelo qual o coágulo é dissolvido pela plasmina permitindo o fluxo sanguíneo normal. (7,12,13,14)

A avaliação da hemóstase em contexto laboratorial auxilia a identificação de diversos distúrbios hemorrágicos e trombóticos e a sua monitorização fornece informações sobre a função plaquetária, fatores da cascata de coagulação e a fibrinólise.

No laboratório Germano de Sousa o equipamento utilizado é Sysmex CS-5100 e alguns dos parâmetros mais analisados são os seguintes:

Tempo de protrombina (TP)

O TP é um parâmetro que avalia essencialmente o funcionamento da via extrínseca da coagulação sanguínea. Mede o tempo que o nosso organismo leva para formar um coágulo de

fibrina aquando da exposição do plasma a tromboplastina tecidual, fator tecidual, lípidos e cálcio que ativam a cascata de coagulação.

Este parâmetro avalia a via extrínseca (fator VII) e a comum (fatores V e X, fibrinogénio e protrombina) e de modo a padronizar resultados utiliza-se a Razão Normalizada Internacional (INR) que é calculada por:

$$INR = \frac{TP \text{ doente}}{TP \text{ controlo}}$$

O valor de referência para um indivíduo saudável esta compreendido ente 0,9 e 1,1 enquanto que para um paciente sob efeito de terapias anticoagulantes aumenta para 2.0 e 3.0.

Um aumento de TP pode indicar deficiências ou disfunções nos fatores II, V, VII, X, ou deficiências de vitamina K. Pode indicar ainda patologias hepáticas como cirroses.

Já a diminuição dos valores de TP podem ser indicativos de aumento da atividade do fator VII. (12,13)

Tempo de tromboplastina parcial ativado (aPTT)

aPTT é um parâmetro analítico que avalia a função da via intrínseca da coagulação sanguínea. Avalia o tempo para a formação dum coágulo de fibrina após exposição do plasma com um ativador de contato, como a sílica, e cálcio. Permite avaliar os fatores VIII, IX, XI e XII da via intrínseca e o fibrinogénio, protrombina, fatores V, X da via comum. O valor de referência é compreendido entre os 23.0 e os 31,9 segundos.

Fibrinogénio

O fibrinogénio é uma proteína solúvel que desempenha um papel fundamental na formação de coágulos de fibrina. O seu doseamento no plasma sanguíneo permite avaliar o funcionamento da cascata de coagulação e a capacidade de formação do coágulo, auxilia o diagnóstico de distúrbios de coagulação e a monitorização de pacientes que estejam sob tratamento de anticoagulantes.

A diminuição de fibrinogénio pode ocorrer devido a distúrbios como coagulação intravascular disseminada (CID) e doenças hepáticas, enquanto que aumento do seu doseamento pode ocorrer em resposta a doenças inflamatórias, inflamações ou gravidez. (12,13)

8. Microbiologia Laboratorial

A Microbiologia Laboratorial é uma área multidisciplinar que foca na caracterização e identificação de microrganismos patogénicos em amostras biológicas, no mecanismo de infeção e pesquisa da melhor terapêutica. (16)

O diagnóstico de infeções, a realização de testes de sensibilidade antimicrobiana (TSA) e o controlo de surtos epidemiológicos fazem igualmente parte da rotina de um técnico de microbiologia.

As infeções podem ser causadas por bactéria, fungos, vírus ou parasitas e ocorrem dependentemente de vários fatores como a virulência do microrganismo ou o estado clínico do doente.

A microbiota é o conjunto de todos os microrganismos que habitam determinado ambiente por um determinado tempo, sendo a microbiota do trato intestinal ou da boca exemplos. Varia de pessoa para pessoa, e difere consoante a idade, dieta, estilo de vida e estado de doença. (16)

Os microrganismos que colonizam os diferentes sistemas vivem em constante simbiose com o Homem. A existência de uma microbiota ajuda na proteção contra microrganismos patogénicos, qualquer desequilíbrio leva a uma fragilidade do nosso organismo e ao aumento da probabilidade de colonização por microrganismos oportunistas e patogénicos.

Num laboratório clínico, a microbiologia é a área menos automatizada, o pessoal técnico deve ter pensamento crítico e conseguir distinguir um microrganismo valorizável de um comensal consoante as diferentes circunstâncias, garantindo o sucesso dos resultados.

É um setor com grandes probabilidades de contaminação onde as boas práticas laboratoriais necessitam de estar presentes para obtenção de bons resultados e para a segurança de todos os técnicos e funcionários do laboratório.

Para o sucesso laboratorial a amostra deve ser viável, colhida de forma adequada consoante o local e transportada para o laboratório o mais rápido possível nas condições necessárias, de modo que a recuperação do microrganismo patogénico seja possível. (16)

Uma boa colheita aumenta as probabilidades de o microrganismo ser identificado, do utente receber atempadamente a terapêutica adequada, da diminuição de possíveis infeções hospitalares e dos custos associados.

8.1 Equipamentos Automatizados

Microbiologia é o setor menos automatizado do Laboratório Germano de Sousa, no entanto a utilização de equipamentos laboratoriais são um auxílio na otimização e agilização dos processos de identificação. A automatização dos equipamentos fornece resultados rápidos e precisos comparados aos métodos manuais, trazendo benefícios clínicos.

No Laboratório Germano de Sousa são utilizados três equipamentos, o MicroScan WalkAway 96 Plus, o VITEK MS, e o VITEK 2.

O **MicroScan WalkAway 96 Plus** é um sistema automatizado de identificação bacteriana e suscetibilidade antimicrobiana, no entanto, no Laboratório Germano de Sousa este equipamento é utilizado em grande parte para realizar testes de suscetibilidade antimicrobiana (TSA).

Permite a identificação de bactérias de Gram negativo fermentadoras e não fermentadoras, cocos Gram positivo e *Listeria*, anaeróbios, leveduras e microrganismos fastidiosos como *Neisseria* e *Haemophilus*, permitindo assim a automatização na identificação de mais de 90% de pedidos de rotina. (18)

Tem uma capacidade de processar simultaneamente 96 painéis que são impregnados com 30 substratos bioquímicos diferentes para identificação bacteriana. O equipamento usa um leitor fotométrico que realiza uma leitura colorimétrica/ turbidimétrica. A suspensão microbiana é feita com um aparelho que inocula as amostras de forma estandardizada, diminuindo o tempo necessário para obter a turvação pretendida. De seguida, as amostras são carregadas para os 96 poços e colocadas no equipamento que funciona a uma temperatura de 35°C.

O MicroScan WalkAway apresenta uma extensa base de dados que compara os resultados obtidos da amostra o que garante uma identificação precisa. (18)

O **VITEK MS** é um equipamento automatizado utilizado na identificação rápida de microrganismos. Funciona por espectrometria de massa e utiliza uma tecnologia de ionização/adesorção a laser assistida por uma matriz – tempo e voo (MALDI-TOF), em poucos minutos identifica a espécie, género e família do microrganismo graças a uma vasta base de dados com microrganismo relevantes, tendo em consideração as diferentes estirpes de uma mesma espécie. (19)

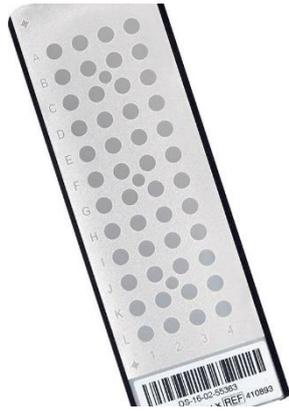


Figura 19 – Slide utilizado no VITEK MS

Colónias puras de bactérias são colocadas em diferentes poços de um slide, que contém uma matriz composta por substâncias químicas que facilita a ionização das moléculas bacterianas durante a análise.

Cada slide é composto por três secções com capacidade de identificar 42 amostras diferentes e com três poços onde é colocada apenas a matriz, servindo de controlo.

O slide é depois introduzido num ambiente de vácuo onde um disparo de laser ioniza a amostra e liberta uma “nuvem” de proteínas que são aceleradas por uma carga elétrica. Após a passagem por um eléctrodo de anel, o tempo de voo das proteínas de cada amostra é analisado por um detetor e quantificado.

As proteínas vão ser detetadas por um sensor que cria um espectro representativo da composição de cada amostra e é comparado com um extenso banco de dados que determina a identidade mais provável da espécie do microrganismo. (19)

O VITEK MS facilita o trabalho na área de microbiologia, no entanto é um equipamento que requer múltiplas calibrações, manutenções e atualizações do banco de dados de modo a garantir qualidade e precisão dos dados que liberta.

No Laboratório Germano de Sousa existem dois equipamentos **VITEK 2** utilizados para a realização de Testes de Sensibilidade Antimicrobiana (TSA) e deteção de resistências de cocos de Gram positivo, bacilos de Gram negativo e leveduras embora também possa ser utilizado para identificação microbiana.

A realização do TSA para um vasto número de microrganismos desde fungos, bactérias de Gram positivo ou de Gram negativo é feita através de cartas de utilização única com diferentes antibióticos.



Figura 20 – Cartas de identificação e de TSA utilizadas no VITEK 2

O equipamento regista as concentrações mínimas inibitórias (CMI) de cada fármaco para cada microrganismo, utilizando um sistema ótico com diferentes comprimentos de onda na zona do visível onde realiza as leituras colorimétricas e turbidimétricas.

Para identificação de microrganismos, o VITEK 2 utiliza cartas com substratos que avalia as atividades metabólicas e o crescimento microbiano na presença de diferentes nutrientes e substratos. (20)

As cartas são utilizadas em suspensões bacterianas de colônias puras de cada amostra em solução salina de 3.0 mL com turvação de 0,5 a 0,63 McFarland e são escolhidas consoante o microrganismo. Esta escolha determina o sucesso do teste.

Tabela 5 – Cartas do VITEK 2 e características

Tipo de Carta	Nome da Carta	Microrganismo associado
TSA	AST 426	Enterobactérias e outras bactérias de Gram negativo
	AST 359	<i>Pseudomonas spp</i>
	AST 648	<i>Staphylococcus spp</i>
	AST 586	<i>Enteroccus spp.</i> e <i>Streptococcus spp</i>
Identificação	GP	Bactérias de Gram positivo
	GN	Bactérias de Gram negativo
	YST	Fungos
	NH	Microrganismos fastidiosos

As cartas e as suspensões bacterianas são inseridas no sistema VITEK 2 onde vão ser incubadas, o sistema realiza leituras automatizadas em intervalos de 15 minutos, avaliando os resultados da sensibilidade a antimicrobianos pela medição do crescimento dos organismos. O TSA indica a atividade antimicrobiana por métodos quantitativos, CMI de cada fármaco efetua uma categorização, por métodos qualitativos, de S, I ou R, sensível, intermediário ou resistente, respetivamente. (20)

Todos os resultados são depois interpretados com base nas normas da European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

O VITEK permite ainda a deteção de padrões de resistência bacteriana como as bactérias produtoras de β -lactamases de espectro alargado (ESBL).

8.2 Meios de Cultura

O exame cultural é etapa fundamental para a identificação e recuperação dos microrganismos que chegam ao laboratório.

Por definição um meio de cultura é uma mistura de várias substâncias utilizadas para promover o crescimento e a manipulação de microrganismo num laboratório, sendo um ambiente artificial que fornece os nutrientes necessários ao seu crescimento.

Existem **meios de cultura diferenciais**, permitem o crescimento de certos microrganismos em relação a outros, pela distinção com base em diferentes características metabólicas. Apresentam substâncias químicas e corantes que alteram padrões de crescimento e características utilizadas na diferenciação presuntiva.

Meios de cultura seletivos, apresentam na sua composição componentes que permitem o crescimento de alguns microrganismos e a inibição de outros, possibilitam o isolamento de microrganismos específicos em amostras complexas, e **meios de enriquecimento**, são geralmente meios líquidos, utilizados para aumentar em número os microrganismos de uma amostra, a sua composição química é rica em nutrientes.

Podemos distinguir ainda os meios de cultura em sólidos (1,5%agar), semi-sólidos (0,5% agar) ou líquidos.

No Laboratório Germano de Sousa os meios de cultura utilizados são os seguintes:

- **Caldo de Selenito** - meio de cultura líquido utilizado para isolamento e enriquecimento seletivo de *Salmonella spp.* e *Shigella spp.*, inibe ainda a maioria das bactérias de Gram positivo e de Gram negativo. (16)
- **Caldo Todd Hedwitt (TBH)** – caldo de enriquecimento para *Streptococcus pneumoniae*. (16)
- **Caldo Cérebro-Coração (BHI)** – meio de cultura líquido enriquecido com nutrientes complexos e substâncias que permitem o crescimento bacteriano. (16)
- **Gelose chromID™ CPS® Elite (CPSE)** – meio de cultura seletivo, diferencial cromogéneo utilizado para o isolamento e identificação de patógenos do trato urinário. (16)
- **Gelose Hektoen (HEKT)** – meio de cultura seletivo e diferencial para bactérias enteropatogénicas como *Salmonella spp.* e *Shigella spp.*

Composto por sais biliares que inibe o crescimento de bactérias de Gram positivo e sais de ferro e tiosulfato de sódio que permite observar a produção de sulfeto de hidrogénio (H_2S) pelos microrganismos. (16)

- **Gelose MacConkey (MCK)** – meio de cultura seletivo e diferencial para bactérias de Gram negativo. Sais biliares e cristal violeta inibe o crescimento de bactérias de Gram positivo e o vermelho neutro é um indicador de pH que permite distinguir bactérias fermentadoras de lactose das não fermentadoras. (16)
- **Gelose de Sangue (COS)** – é um meio de cultura não seletivo, permite o crescimento de diversos tipos de microrganismos e a observação dos três tipos de hemólise α , β e γ . (16)
- **Gelose de Chocolate + PolyVitex (PVX)** – meio de cultura que permite o crescimento de bactérias fastidiosas como *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae*. É um meio feito a partir de sangue cozido, desfibrinado e hemolisado que contém nutrientes intracelulares como fator X (hemina) e V (NAD – Nicotinamida Adenina Dinucleótido) necessários ao crescimento das bactérias em causa. (16)
- **Gelose de Chocolate PolyVitex VCAT3 (VCAT)** – Meio de cultura seletivo para *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*. Na sua constituição inclui vancomicina, colimicina, anfotericina e trimetoprimo que inibe o crescimento de bacilos de Gram negativo e leveduras. Inclui ainda nutrientes e hemoglobina, fonte dos fatores V e X essenciais para o crescimento de *Neisseria*. (16)
- **Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro com Colistina e Ácido Nalidíxico (CNA)** – meio de cultura seletivo utilizado para o isolamento e diferenciação de bactérias de Gram positivo, como estreptococos e estafilococos. A adição de sangue de carneiro permite observar reações de hemólise e a colistina permite a inibição de bactérias de Gram negativo. (16)
- **Gelose Campyloset (CAM)** – meio de cultura seletivo para o isolamento e identificação de *Campylobacter spp.*, inclui antibióticos que inibe o crescimento de outros microrganismos e fatores de crescimento complementares para o crescimento seletivo de *Campylobacter spp.* (16)
- **Gelose de Chocolate *Haemophilus spp.* (HAEM)** – meio de cultura seletivo para o isolamento e identificação de *Haemophilus spp.*, que inibe o crescimento de outros microrganismos, com adição de antibióticos e os fatores V e X de modo a otimizar o crescimento deste microrganismo. (16)

- **Gelose de Chapman (MSA2)** – meio de cultura seletivo para *Staphylococcus spp.*, a adição de cloreto de sódio inibe o crescimento de muitas bactérias e o vermelho fenol é um indicador de pH que muda de cor em resposta à fermentação do manitol pelas bactérias. (16)
- **Gelose de Sabouraud (SCG2)** – meio de cultura seletivo para o isolamento e contagem de fungos filamentosos e leveduras, o pH ácido (pH 5,6) inibe o crescimento de muitas bactérias que preferem pH neutros e a adição de peptona permite o crescimento fúngico. (16)
- **Gelose Granada (GRAN)** – meio de cultura seletivo para o isolamento de *Streptococcus agalactiae*, granada é um corante que inibe o crescimento de bactérias de Gram positivo, exceto as Estreptococos do grupo B. (16)

8.3 Amostras Biológicas

No Laboratório Germano de Sousa os produtos mais analisados são de urina, fezes, e exsudados vaginais. Amostras de líquido cefalorraquidiano, exsudados purulentos ou de expetoração aparecem com menos frequência.

As amostras de hemoculturas são um caso a parte pois chegam ao Laboratório Germano de Sousa de Lisboa já processadas e diagnosticadas como positivas pelos diversos postos.

É efetuada uma coloração de Gram do meio líquido, observado ao microscópio e feita uma subcultura em meio de COS e PVX, entre 24 a 48 horas, a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 . Depois da leitura e valorização da placa, é efetuado o isolamento das estirpes (se necessário), identificação e executado o TSA por métodos automáticos. Quando há crescimento de mais de três estirpes o resultado é atribuído como contaminação.

Antes do processamento de qualquer outro tipo de amostras, os técnicos devem verificar sempre se a colheita e o transporte foram efetuados da maneira correta para garantir a inexistência de contaminações.

Após a passagem do teste macroscópico, são feitas lâminas para as colorações de Gram e/ou Ziehl-Neelsen.

Os métodos de coloração são importantes uma vez que permitem a caracterização e classificação inicial das bactérias e identificação da presença ou ausência de elementos figurativos como leucócitos ou eritrócitos na amostra.

A coloração de Gram permite a distinção entre bactéria de Gram negativo de Gram positivo e a coloração Ziehl-Neelsen permite identificar bactérias ácido-álcool resistentes.

O exame microscópico direto é feito com uma suspensão de amostra em soro fisiológico, sem coloração, consoante o tipo de produto.

As amostras são depois semeadas em meios de cultura consoante as suas características e incubadas na estufa a temperaturas e atmosferas específicas.

Após crescimento, as colónias são observadas pela cor, tamanho, cheiro, brilho das colónias e se valorizadas em contexto clínico seguem para identificação e realização do TSA pelos equipamentos.

Na Tabela 6 encontra-se um resumo das principais amostras e do seu processamento.

Tabela 6- Processamento dos diferentes produtos biológicos						
Produto	Meio Líquido	Meio Solido	Coloração de Gram	Coloração de Ziehl-Neelsen	Exame Fresco	Incubação em 5% CO ₂
Urina	-	CPSE	-	-	+	-
Fezes	Selenito	MCK/HEKT	-	-	+	-
Exsudado Vaginal	-	COS/SCG2	+	-	+	-
Exsudado Uretral	-	PVX/VCAT	+	-	+	PVX/VCAM
LCR	BHI	PVX/COS	+	+	-	PVX/COS
Exsudados Purulentos	BHI	CNA/MCK/PVX	+	+	-	PVX
Exsudados Purulentos-zaragatoa	-	CNA/MCK	-	-	-	-
Líquidos Cavidades Serosas	BHI	PVX/COS/MCK	+	+	-	PVX/COS
Expetoração ou Secreções Brônquicas	-	COS/HAE2/MCK	+	+	-	HAE2/ COS
Exsudado Nasal	-	COS	-	-	-	-
Exsudado Faríngeo	-	CNA	-	-	-	CNA

8.3.1 Urina

A amostra de urina é o produto mais processada no Laboratório Germano de Sousa.

A Infecção do Trato Urinário (UTI) é uma das causas mais comuns de infeções na população geral e ocorre quando bactérias ou outros microrganismos invadem o sistema urinário, multiplicando-se, causando uma resposta inflamatória.

A infeção é classificada de acordo com o local de atuação. Cistite é denominada a uma infeção que ocorre na bexiga, uretrite, se for na uretra ou pielonefrite caso a infeção for renal sendo esta última a mais grave. (21)

A bexiga e os rins são locais estéreis, mas a uretra apresenta uma microbiota característica, o que determina o jato intermédio de urina como a forma mais indicada de efetuar a colheita para análise.

As mulheres, comparativamente aos homens, apresentam maior probabilidade de serem diagnosticadas com uma UTI, devido a anatomia da uretra, é mais curta e mais próxima do ânus, e a constituição da urina no homem é mais inibitória ao crescimento bacteriano devido ao pH baixo, a osmolaridade elevada e à presença de fluídos prostáticos. (21)

As UTIs são na sua maioria causadas por *Escherichia coli*, a restante percentagem é causada por bactérias como *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterococcus* e *Staphylococcus* e outros Gram negativo como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp* e Gram positivo como *Staphylococcus saprophyticus* ou *Staphylococcus aureus*. (21)

A colheita do jato intermédio da primeira urina da manhã é feita pelo utente após higiene íntima para evitar contaminações, é colocada num contentor estéril e transportada para o laboratório para ser processada e analisada.

A urina tipo II é efetuada quando pedido pelo prescriptor, é realizado um exame sumário da urina seguido de visualização do sedimento.

A análise é executada de modo automatizado pelo UNAMAX, que utiliza tiras impregnadas com reagentes para analisar parâmetros químicos como proteínas, glicose, eritrócitos, pH, entre outros. A amostra é depois centrifugada a 2500 rpm durante 5 minutos e noutro equipamento, o SEDIMAX, observa ao microscópico a amostra onde analisa o sedimento urinário permitindo identificar elementos figurados como leucócitos, células epiteliais, cilindros e outros.

Do sedimento urinário é feita uma lâmina para Coloração de Gram, se necessário, e caso prescrito pelo clínico, uma lâmina para Coloração de Ziehl-Neelson.

A segunda parte do processo é a identificação e quantificação dos microrganismos presentes na amostra.

A urina é homogeneizada e semeada com uma ansa estéril de 10.0 ul para metade de uma placa com gelose CPSE e vai incubar em aerobiose, durante 24 horas numa estufa a 37°C.



Figura 21 – Gelose de CPSE dividida para duas amostras

O Laboratório Germano de Sousa possui um grande fluxo de trabalho de amostras de urina. No início do turno de cada dia, as placas de CPSE são divididas o que possibilita semear duas amostras numa única placa diminuindo gastos materiais.

A gelose de CPSE é um meio diferencial para *E.coli*, as colónias apresentam uma coloração rosada que permite a identificação direta. As colónias de outros uropatógenos são também identificadas de forma presuntiva na gelose de CPSE.

Uma boa interpretação das culturas deve seguir regras. Quando crescem mais de três patogénicos numa cultura e cujo sedimento apresente múltiplas células epiteliais e leucócitos, a amostra deve ser descartada por contaminação e pedida nova recolha ao utente.

Pelo contrário, quando crescem um ou dois uropatógenos de forma significativa ($\geq 10^2$ UFC/ml a $\leq 10^5$ UFC/ml), a amostra é diretamente identificada e efetuado o TSA.

No entanto, se apenas uma pequena quantidade de uropatógenos crescerem é necessária aprovação do clínico para proceder a identificação.

Uma cultura com pouco ou nenhum crescimento é dada como negativa e o processo termina.

8.3.2 Fezes

As fezes são o segundo grupo de produtos, depois da urina, mais analisados no setor de Microbiologia no Laboratório Germano de Sousa.

As infeções gastrointestinais são bastante frequentes em todo o mundo, incluindo Portugal, e apesar das diversas defesas que o nosso organismo tem contra certos patógenos como acidez do suco gástrico no estômago, motilidade do intestino delgado, presença de anticorpos IgA ou a enorme colonização de microrganismos no colón, os patógenos conseguem ultrapassar as barreiras e causar infeções graves.

8.3.2.1 Coprocultura

A cultura de fezes permite identificar os microrganismos responsáveis por infecções gastrointestinais, possibilita o despiste de *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* e, se requisitado *Campylobacter spp.* (22)

Estas bactérias podem levar ao aparecimento de doenças como salmonelose, febre tifoide, disenteria bacilar, através dos seus fatores de virulência, invadem as células epiteliais da mucosa intestinal e causam inflamação caracterizada pelo aparecimento de vômitos, diarreia, sangue e muco nas fezes. A libertação de toxinas, aumento da motilidade intestinal e o efeito citotóxico são outros mecanismos utilizados pela *Salmonella spp.* que leva ao aparecimento de diarreia. (22)

A colheita deve ser feita pelo utente para um contentor estéril de pelo menos três amostras que depois segue para processamento no laboratório.

Quando chega ao laboratório é feito um exame macroscópico direto para verificar a consistência das fezes, líquidas ou formadas, e observação de muco e/ou sangue.

De seguida, efetua-se um exame direto a fresco no microscópio para pesquisa de leucócitos nas fezes.

O exame cultural começa com a repicagem de pequenas quantidades das três amostras para 1.0 ml de solução salina.

Para o despiste de *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* o preparado anterior vai ser inoculado nos meios MCK e HEKT numa atmosfera de aerobiose, a 37°C, durante 24 horas e num Caldo de Selenitos durante 12/18 horas a 37°C.

Este caldo é seletivo e diferencial, aumenta em quantidade as bactérias de *Salmonella spp* e inibe o crescimento de outras enterobactérias. No seguinte dia, as bactérias que crescem no caldo são inoculadas numa placa com meio de HEKT incubada em aerobiose, a 35°C, durante 24 horas.

Ao terceiro dia é feita a leitura das placas, em gelose de MCK, colónias incolores correspondem a bactérias não fermentadoras de lactose como *Salmonella spp.* e *Shigella spp.*, podendo aparecer colónias cor de rosa associadas a microbiota intestinal.

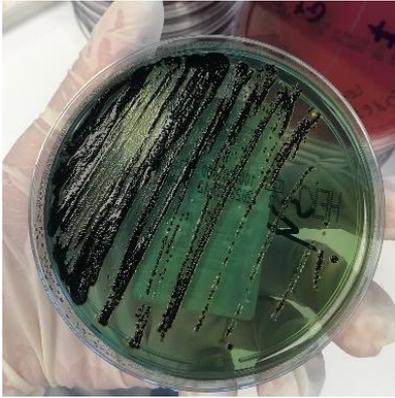


Figura 22 – Gelose de HEKT com crescimento de *Salmonella spp*

Na gelose HEKT, as bactérias *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* crescem em colónias transparentes (não fermentadoras de lactose) e *Salmonella spp.* apresentam ainda um centro negro devido à produção de H₂S.

Para pesquisa de *Campylobacter spp.*, as amostras são semeadas no meio CAM e incubadas numa atmosfera de microaerofilia a 37°C durante 48 horas.

Quando há crescimento é efetuada uma coloração de Gram para observar ao microscópico.

No laboratório Germano de Sousa, na pesquisa de *Helicobacter pylori* é utilizado um teste rápido de antígeno baseado em imunocromatografia nas amostras de fezes.

8.3.2.2 *Clostridium difficile*

A pesquisa de *Clostridium difficile* é um exame realizado com requisição do clínico.

Clostridium difficile é uma bactéria bacilo de Gram positivo patogénica que coloniza o trato intestinal e produz uma enterotoxina, toxina A, e uma citotoxina, toxina B que provoca colite pseudomembranosa. A colonização deste bacilo, deve-se em grande percentagem, a toma de antibióticos de amplo espectro que acaba por alterar o equilíbrio da microbiota do intestino permitindo que este patogénico cresça e se estabeleça no intestino. (23)

Para a sua deteção utiliza-se um teste imunoenzimático rápido que permite a deteção das toxinas A e B do *Clostridium difficile*.

8.3.2.3 Exame Parasitológico

O exame parasitológico das fezes tem como objetivo identificar a presença de parasitas e/ou ovos e trofozoítos nas fezes. Os parasitas são os protagonistas de uma grande percentagem de infeções gastrointestinais existentes em crianças, imunodeprimidos, viajantes e outros.

Os principais contribuintes destas infeções são *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum* entre outros. (24)

Para a realização deste exame a colheita deve ser efetuada pelo utente, três amostras em dias não consecutivos, aumentando a probabilidade da recolha dos parasitas nas amostras.

Após chegada ao laboratório, realiza-se um exame macroscópico para observação de sangue ou muco e também de elementos parasitários como ovos, quistos ou os próprios parasitas. De seguida, realiza-se o exame microscópico, onde é utilizado um kit específico, é colocada uma pequena quantidade de fezes (repicagem das 3 amostras) num tubo com uma solução de formalina a 10% e depois adicionado um solvente de lípidos, acetato de etilo.

A mistura é colocada noutra tubo com um filtro e vai centrifugar, as estruturas de maior dimensão como os elementos parasitários vão permanecer num sedimento limpo e livre de lípidos ou outras estruturas.

O sedimento é depois observado ao microscópio, primeiro em objetiva de 10x e depois em 40x.

No Laboratório Germano de Sousa, para pesquisa de *Giardia lamblia* é executado, se prescrito, um teste imunocromatográfico para a deteção dos antigénios deste parasita.

8.3.2.4 Adenovírus e Rotavírus

São vírus, muitas vezes, os agentes etiológicos das infeções gastrointestinais, principalmente em crianças. Os vírus atacam as células das vilosidades do intestino delgado diminuindo a capacidade de absorção e causando diarreias pelo aumento da quantidade de água e eletrólitos no lúmen do intestino. (25)

No Laboratório Germano de Sousa para pesquisa de Adenovírus e Rotavírus são utilizados testes rápidos imunocromatográficos que detetam antigénios destes vírus em amostras de fezes.

8.3.3 Exsudados Urogenitais (Uretral e Vaginal)

Os exsudados urogenitais estão associados a infeções vaginais em mulheres, pesquisa de *Ureaplasma spp.*, *Mycoplasma spp.* e diagnóstico de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) em ambos os sexos. (26)

A vagina da mulher é colonizada por um elevado número de microrganismos em especial uma bactéria de Gram positivo, *Lactobacillus spp.*

Quando ocorre um desequilíbrio da microbiota vaginal, bactérias oportunistas acabam por proliferar e causar infeções vaginais. (28)

A colonização equilibrada de *Lactobacillus spp* e outras leveduras permite a manutenção de um ambiente ácido na vagina, estas bactérias produzem ácido láctico a partir de glicogénio presente nas células epiteliais e o ambiente criado acaba por inibir a colonização de bactérias patogénicas. (27,28)

No entanto com o avançar da idade, mudanças da dieta, alterações hormonais ou uso de antibioterapia há alteração na microbiota vaginal e bactérias oportunistas como *Gardnerella vaginalis* e leveduras como *Candida spp*, conseguem proliferar e provocar vaginoses e candidíases respetivamente.

As infeções vaginais em mulheres podem ainda ser causadas por *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus ducreyi* ou *Trichomonas vaginalis*.

Nos homens, as amostras são maioritariamente de uretrites causadas por DST ou infeções causadas por *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma spp*. e *Mycoplasma spp* (26)

Nestas situações, os exsudados são colhidos em zaragatoas secas por um profissional técnico e transportados em meio de transporte de Stuart ou Amies com carvão.

Após chegada ao laboratório, são feitos dois esfregaços de ambos os exsudados.

Um esfregaço para coloração de Gram que permite ao microscópio visualizar a microbiota, a presença de “clue cells” em mulheres e a predominância de algum tipo morfológico nos homens.

A presença de “clue cells” em exsudados vaginais é indicativo de colonização de *Gardnerella vaginalis*.

O outro esfregaço é observado a fresco, ao microscópio e permite identificar os trofozoítos flagelados e elementos leveduriformes característicos de infeção por parte de *Trichomonas vaginalis* e *Candida Albicans* respetivamente.

De seguida, os exsudados vaginais vão ser inoculados em meios COS e SCG2 em aerobiose a 37°C durante 48 horas.

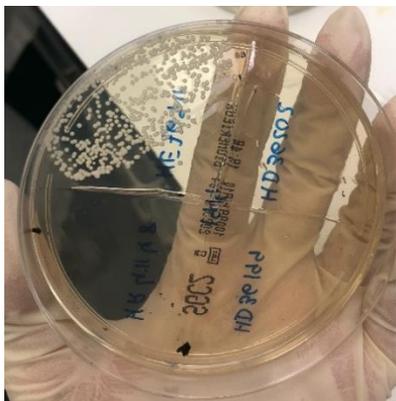


Figura 23 – Meio de SCG2 com crescimento de *Candida albicans*

Candida albicans cresce no meio de SCG2, é um fungo caracterizado pelas colónias brancas e muito redondas. Quando há crescimento em cultura é realizada uma prova de filamentação, consiste na suspensão de uma colónia isolada para 1.0 ml de soro humano que vai incubar a 37°C durante três horas.

As amostras são depois observadas ao microscópio e aquando do aparecimento de um tubo germinativo, que corresponde

ao início de uma hifa, é diagnosticado infecção por *Candida albicans*.

Os microrganismos que cresceram no meio de COS, e valorizados pelo clínico, são de seguida identificados nos equipamentos automatizados.

Os exsudados uretrais vão ser inoculados nos meios PVX e VCAT em aerobiose e em atmosfera de 5 a 7 % de CO_2 a 37°C durante 48 horas.

Os dois meios são seletivos ao crescimento de *Neisseria gonorrhoeae* onde aparece como pequenas colónias acinzentadas.

A coloração de Gram permite a identificação presuntiva de *Neisseria gonorrhoeae*, bactéria diplococos de Gram negativo, não flagelada que pode ser encontrada dentro ou fora de neutrófilos polimorfonucleares dependendo da cronicidade da infecção.

Nas grávidas, é aconselhada a pesquisa de *Streptococcus* do Grupo B, entre as 35^o e as 37^o semanas. *Streptococcus agalactiae* é uma bactéria bastante comum no trato genital de jovens adultas e a sua exposição a recém-nascidos pode levar a infeções graves como septicémia, pneumonia ou meningite. (29)

Às grávidas é recolhida amostras de exsudados vaginais e uretrais, as zaragatoas são inoculadas no meio de enriquecimento *Todd Hewitt* a 37°C por 48 horas e depois semeadas no meio GRAN em aerobiose e em atmosfera de 5% a 7% de CO_2 , durante 24 horas, a 37°C.

As amostras positivas para *Streptococcus agalactiae* apresentam colónias alaranjadas.

8.3.4 Líquido Cefalorraquidiano (LCR)

O LCR é um fluido incolor que preenche as cavidades do cérebro, confere proteção e suporte mecânico regulando a pressão intracraniana, o transporte de nutrientes e remoção de resíduos metabólicos.

A colheita consiste numa punção lombar, um processo invasivo, de modo que o transporte e processamento devo ser exímio e não comprometer o diagnóstico. O LCR permite a identificação de agentes etiológicos de infeções como encefalites e meningites. (30)

No laboratório, é feita uma observação macroscópica para avaliar o aspeto físico do LCR, a presença de turvação ou sangue indicam de imediato anormalidade.

De seguida são feitas duas lâminas, para observar ao microscópio em coloração de Gram e em coloração de Ziehl-Neelsen, fornecendo informação sobre a presença ou ausência de microrganismos.

De seguida, a amostra é centrifugada e inoculada num caldo de BHI, incubado em aerobiose a 37°C durante 24 horas, permitindo o crescimento em quantidade das bactérias presentes na amostra. Ao segundo dia, o LCR é inoculado em meios PVX e COS em aerobiose e em condições de 5% a 7% de CO_2 durante 24 horas.

A identificação e antibiograma é efetuada depois nos equipamentos automatizados.

8.3.5 Exsudados Purulentos

Os exsudados purulentos são fluidos inflamatórios com elevadas concentrações de leucócitos e detritos celulares provenientes da resposta do sistema imunológico à infeção bacteriana.

A pele é a primeira defesa contra a colonização de patogénicos, sendo habitat de diversos microrganismos comensais que conferem proteção e aquando da diminuição das defesas ou ruturas na barreira, uma infeção provocada por bactérias pode ocorrer. (16)

As bactérias patogénicas são fagocitadas por leucócitos e este processo leva a libertação de enzimas e outras substâncias inflamatórias que juntamente com os restos celulares formam pus e abcessos.

Os patogénicos mais comuns encontrados em exsudados purulentos são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*.

A colheita destes produtos pode ser realizada por zaragatoas, seringas ou contentores, de forma cuidadosa, pois as amostras têm grande probabilidade de contaminação das bactérias comensais existentes na pele.

Depois de chegar ao laboratório e serem processadas, as amostras de pus em seringas, tubos e frascos são tratadas de maneira diferente dos exsudados em zaragatoa.

Às primeiras é feita um esfregaço com Coloração de Gram e outro com Coloração de Ziehl-Neelsen, para observar ao microscópio. De seguida procede-se ao exame cultural, onde a amostra é inoculada no meio de enriquecimento BHI durante 24 horas a 37°C e depois em CNA, MCK e PVX incubados a 37°C durante outras 24 horas. No meio PVX a amostra é inoculada em atmosfera de 5% a 7% de CO_2 .

As amostras de pus em zaragatoas são semeadas nos meios de CNA e MCK e incubadas a 37°C durante 24 horas.

A identificação e realização do TSA é depois efetuada por métodos automáticos.

Para correta identificação do agente etiológico da infeção, a interpretação dos técnicos e do clínico deve ser cuidadosa pois são amostras contaminadas com facilidade e cabe ao pessoal

técnico saber discriminar o que deve ser ou não valorizado dependendo do microrganismo, do local e do tipo de colheita.

8.3.6 Líquidos das Cavidades Serosas

Os líquidos ascítico, sinovial, peritoneal, pleural e pericárdico são fluidos estéreis, e todo o crescimento bacteriano deve ser valorizado e identificado. (16)

A colheita das amostras é realizada por um técnico que diminui a probabilidade de contaminações.

Após chegada ao laboratório, são efetuadas duas lâminas para observar ao microscópio, uma de Coloração de Gram e outra de Coloração de Ziehl-Neelsen.

No exame cultura, as amostras são primeiramente inoculadas num caldo de enriquecimento de BHI, a 37°C durante 24 horas, depois são semeadas em PVX, COS e MCK, a uma temperatura de 37°C durante mais 24 horas e em PVX e COS inoculadas numa atmosfera com 5% a 7% de CO_2 durante também 24 horas.

Qualquer crescimento é depois identificado por métodos automatizados e realizado o TSA.

8.3.7 Amostras do Trato Respiratório

8.3.7.1 Trato Respiratório Superior

O Trato Respiratório Superior apresenta mecanismos naturais que impedem a colonização de patogénicos, além da presença de uma microbiota característica, pelos nasais, mucosa, imunoglobulinas secretoras (IgA) e células inflamatórias fagocíticas fazem parte de uma barreira difícil de ultrapassar. No entanto, aquando de um desequilíbrio na microbiota ou do comprometimento do sistema imunológico pode ocorrer infeções do trato respiratório como faringites ou sinusites. (16)

Streptococcus pyogenes, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* são as bactérias predominantes de infeções no trato respiratório superior. (30)

Ao laboratório chega amostras de exsudados nasais ou exsudados faríngeos.

Os exsudados nasais tem duas finalidades: a deteção de *Staphylococcus aureus* metilina resistentes (MRSA) de pessoas em pré-operatório ou o despiste para outros patogénicos

como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*.

MRSA é um problema de saúde pública, e o conhecimento da sua localização é essencial para o tratamento, uma vez que são bactérias resistentes a uma ampla gama de antibióticos.

As amostras são semeadas em MSA2 a 37°C durante 24 horas, este meio é cromogéneo específico para *Staphylococcus spp.* e permite a identificação presuntiva de *Staphylococcus aureus*, as suas colónias aparecem amarelas pela fermentação de manitol.

De seguida é feita identificação de forma automática e realizado TSA.

As amostras nasais para despiste de outros patógenos, são inoculadas em meio COS durante 24 horas a 37°C. Já as amostras faríngeas são semeadas em meio CNA em condições de aerobiose a 37°C durante 24 horas e em condições de 5% a 7% de CO_2 a 37°C durante mais 24 horas.

8.3.7.2 Trato Respiratório Inferior

Infeções do Trato Inferior são as mais preocupantes, infeções como bronquites e pneumonias podem ser fatais. O trato respiratório inferior é estéril, no entanto, há ocorrência de colonização por bactérias patogénicas. (31)

Os agentes etiológicos mais comuns são *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae*. (31)

Expetorações ou lavagens brônquicas são as amostras mais processadas e a qualidade destas determina o resultado. Devem ser amostras colhidas pela manhã, sem ingestão alimentar, obtidas através de tosse profunda sem saliva, de modo aumentar a probabilidade de obtenção da bactéria patogénica.

No laboratório, é realizado primeiramente uma lâmina para Coloração de Gram para valorização, o Gram avalia a qualidade da amostra através da contagem de neutrófilos e de células epiteliais.

A amostra é rejeitada com contaminação da orofaringe e da microbiota associada e é aceite quando em objetiva de 10x no microscópio são observadas menos de 10 células epiteliais e pelo menos 25 neutrófilos por campo.

Ao microscópio é também visualizada uma lâmina corada de Ziehl-Neelsen para observar bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR).

De seguida é efetuado o exame cultural, as amostras são inoculadas em meios de COS, HAEM e MAK em aerobiose durante 12 a 48 horas a 37°C e em condições de 5% a 7% de CO_2 em HAEM e COS a 37°C durante 42 horas.

A gelose de chocolate é um meio seletivo para o crescimento de pequenas colónias redondas e translúcidas de *Haemophilus influenzae*.

A gelose de COS auxilia na identificação de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* através da observação da β -hemólise e α -hemólise respetivamente.

A prova de optoquina é um método de identificação presuntiva de *S. pneumoniae*, esta bactéria é sensível ao antibiótico e o aparecimento de um halo de inibição permite caracteriza-la.

Colónias com crescimento são identificadas pelos equipamentos e realizado o TSA.

8.4 Testes de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA)

O TSA permite ao clínico a escolha do melhor antibiótico para erradicar uma infeção causada pelos microrganismos patogénicos, determina se os microrganismos são sensíveis ou resistentes a atividade dos fármacos utilizados na terapêutica. (16)

No Laboratório Germano de Sousa a maioria dos TSA é realizada de forma automatizada no VITEK 2 e no MicroScan WalkAway 96 Plus, estes equipamentos determinam a CMI de cada antibiótico sendo depois interpretados com base nas normas da EUCAST.

O TSA manual é feito por dois métodos, o E-Test e o método de Kirby-Bauer modificado (difusão em disco). (16)



Figura 24 – Método de Kirby-Bauer modificado

O método de difusão em disco consiste na colocação de discos de papel de filtros impregnados com concentrações conhecidas de antibióticos num meio de Muller Hinton com 5% sangue de ovelha, que foi anteriormente semeado com uma suspensão bacteriana de 0,5 McFarland de turbidez pela técnica de sementeira de toalha.

Após incubação das placas durante 24 horas, é medido os halos de inibição em milímetros, e após interpretação com base nas normas da EUCAST, é possível determinar se o microrganismo é sensível ou resistente aos respetivos antibióticos.

O método E-Teste consiste na utilização de uma tira E-Test que é colocada com uma pinça estéril num meio inoculado com a suspensão bacteriana da amostra.

Após incubação, observa-se uma zona de inibição de forma elíptica onde o valor da CMI é obtido no ponto da extremidade em que a elipse intersecta a tira do teste.

Os resultados são também interpretados com base nas normas da EUCAST.

9. Casos Clínicos

1) Doente com 33 anos do sexo feminino dá entrada na CUF com astenia, palidez e cansaço generalizado, com amenorreias há 5 meses.

O exame físico revelou apenas palidez mucocutânea e foi-lhe prescrito um teste de gravidez, hemograma e testes bioquímicos.

A gravidez foi excluída por testes imunológicos e o hemograma revelou uma anemia microcítica e hipocrômica (Hg de 7,3 g/dL, VGM de 75.0 fL e HGM de 24.0 pg).

Testes complementares revelaram que a anemia tinha origem ferropénia com valores de ferritina de 2.0 ng/mL (valores de referência 30.0 a 50.0 ng/mL), sem deficiência de vitamina B12 nem ácido fólico.

Apresentava ainda uma leucocitose (16900.0 u/L), uma trombocitose (553000.0 u/L) e uma VSE de 50.0 mm.

Os testes bioquímicos não revelaram alterações anormais na função tiroidea, renal e hepática, os parâmetros do ionograma também se encontravam dentro dos valores de referência.

Seguidamente, a utente foi submetida a uma endoscopia digestiva alta (EDA) onde não foram observadas lesões que ajudassem no diagnóstico.

Foi efetuada uma biópsia que mostrou uma inflamação no duodeno, um infiltrado linfoplasmocitário intraepitelial e estruturas parasitárias de *Giardia lamblia*.

Esta infeção foi confirmada também pela execução de um teste imunocromatográfico das fezes da utente onde foram detetados antígenos de *Giardia lamblia*.

A utente foi diagnosticada com uma giardíase que causou posteriormente uma anemia microcítica e hipocrômica ferropénia.

A giardíase é uma infeção que ocorre no trato gastrointestinal e é causada pelo protozoário *Giardia lamblia*. O parasita provoca síndrome de má absorção, interferindo na absorção de micronutrientes como o ferro, como ocorreu no caso descrito. (32)

2) Doente do sexo masculino com 48 anos relata náuseas, vômitos, febre.

O exame físico revela ictéria, hepatoesplenomegalia e eupneia, o clínico prescreveu hemograma, testes bioquímicos e sorologia.

O hemograma revelou uma ligeira anemia (H_g de 12,8 g/dL), leucopenia e trombocitopenia.

O ionograma, ureia e creatinina apresentavam valores dentro do normal, no entanto os parâmetros da função hepática estavam alterados.

Tabela 7- Parâmetros bioquímicos avaliados

Parâmetro	Resultado	Valores de Referência
Bilirrubina Total	3,2 mg/dL	0,1-1,0 mg/dL
Bilirrubina Direta	1,1 mg/dL	0,0-0,3 mg/dL
ALT	1980 U/L	10-40 U/L
AST	1805 U/L	15-40 U/L
GGT	100 U/L	8-78 U/L
FA	238 U/L	30-100 U/L

A sorologia apresentou os seguintes resultados:

Tabela 8- Parâmetros serológicos avaliados

Parâmetro	Resultado	Valores de Referência
agHBs	Positivo	Positivo \geq 1,0
anti-HBs	Não Reativo	Reativo \geq 1,0
anti-HBc	Reativo	Reativo \geq 1,0
agHBe	Positivo	Positivo \geq 1,0
anti-HBe	Não reativo	Reativo \geq 1,0

O diagnóstico foi uma hepatite B aguda.

A hepatite B é uma doença infecciosa que provoca danos nas células do fígado.

Os valores das transaminases estão elevadas devido ao dano hepático, são marcadores importantes que avaliam a extensão do dano e o progresso da infecção.

A hepatite B diagnosticada encontra-se ainda na fase aguda pois os primeiros marcadores de infeção estão presentes - agHBs e anti-HBc.

O anti-HBc esta presente durante todo o período de infeção e a deteção de agHBs aponta uma infeção aguda precoce. O doente encontra-se dentro da janela imunológica da Hepatite B. Um agHBe indica níveis elevados de replicação viral e alta infeção.

Como a infeção foi considerada aguda é recomendado ao utente voltar a fazer análises no mês seguinte para verificar cronicidade ou resolução da infeção.

A persistência de agHBs e de anti-HBc durante mais de seis meses são marcadores de infeção crónica da Hepatite B.

A cronicidade da infeção é acompanhada também pela diminuição dos valores anteriormente alterados das transaminases.

10. Conclusão

O meu estágio no Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa foi uma experiência bastante enriquecedora a nível profissional e pessoal.

Apesar da formação teórica ao longo dos dois anos que o mestrado em Análises Clínicas nos fornece, foi durante o estágio que compreendi a complexidade da área de Análises Clínicas.

O contacto com a rotina laboratorial e a integração nas diversas equipas técnicas mudou a minha realidade sobre o que é trabalhar num laboratório e nestes seis meses constatei que todos os profissionais de saúde são extremamente competentes e qualificados, no entanto pouco valorizados como tal pelo Sistema Nacional de Saúde do nosso país.

Adquiri conhecimentos dos principais métodos de trabalho manuais e automáticos, dos equipamentos e metodologias utilizadas e da interpretação clínica dos parâmetros analisados nas diversas áreas que acompanhei.

A nível pessoal vivenciei pela primeira vez como é o mundo do trabalho, as relações que se criam e o espírito de trabalho de equipa o que foi bastante interessante e diferente daquele que estava habituada na Universidade.

Com a minha passagem pelo laboratório compreendi o quão importante a área de Análises Clínicas é a nível hospitalar e de rotina, um bom diagnóstico e monitorização e uma terapia direcionada é apenas possível devido ao trabalho exaustivo dos técnicos de análises clínicas.

A importância dos controlos e do sistema de gestão de qualidade permite ao laboratório ter confiança perante os utentes e os clínicos.

Em suma, todas as vertentes deste estágio foram importantes a nível académico e considero que os principais objetivos foram cumpridos.

Para mim foi uma experiência que nunca vou esquecer muito graças a todo o incrível pessoal técnico que me acompanhou no laboratório e aos quais eu agradeço.

II. Bibliografia

- (1) DARWISH, Ibrahim A.- **Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances**. International journal of biomedical science. 2,3 (2006), 217-235.
- (2) SILVA, Teresa Lopes, et al.- **Citometria de fluxo: funcionalidade celular on-line em bioprocessos**. Boletim de Biotecnologia. (2004) 32-40.
- (3) BACALL, Nydia S.- **Analizador automático hematológico e a importância de validar novos equipamentos em laboratórios clínicos**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. (2009) 218-220.
- (4) CHAKRAVARTHY, V. Kalyan et al. - **Haemoglobin Estimation by Non-cyanide Methods**. Journal of Clinical & Diagnostic Research. 6 (2012) 955-958.
- (5) MUKAIDE, Kae - **Overview of the Automated Coagulation Analyzer CS-5100**. Sysmex Journal International. 23,1 (2013) 1-10.
- (6) **DIESSE - Cube 30 Touch**. Disponível em WWW:<URL:<https://www.menarinidiag.pt/pt-pt/home/diagnóstico-profissional/hematologia/velocidade-de-sedimentação-globular/diesse-cube-30-touch#CHARACTER-STICAS>>.
- (7) HOFFBRAND, A. Victor; MOSS, Paul AH. - **Fundamentos em Hematologia de Hoffbrand**. 7º Ed. UK: Artmed Editora, 2017, ISBN 8582714513, 9788582714515.
- (8) BUTTARELLO, Mauro; PLEBANI, Mario - **Automated Blood Cell Counts: State of the Art**. American journal of clinical pathology, 130,1 (2008) 104-116.
- (9) HOFFBRAND, Victor, et al. - **Color Atlas of Clinical Hematology: Molecular and Cellular Basis of Disease**. John Wiley & Sons, 2019.
- (10) BAIN, Barbara J. - **Blood cells: a practical guide**. John Wiley & Sons, 2021.
- (11) NAOUM, Paulo C.; NAOUM, Flavio A. - **Hematologia laboratorial. Eritrócitos**. Editora Academia de Ciência e Tecnologia, S. J. Rio Preto, 2006.
- (12) CIESLA, Betty. - **Hematology in practice**. Fa Davis, 2018.
- (13) BAIN, Barbara J.; BATES, Imelda; LAFFAN, Mike A. - **Dacie and lewis practical haematology e-book**. Elsevier Health Sciences, 2016.
- (14) SMITH, Larry et al.- **Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications**. (S.I.). Elsevier - Health Sciences Division, 2019. ISBN 9780323530453.

- (15) SANTOS, V. M.; CUNHA, S. F. de C.; CUNHA, D. F. - **Velocidade de Sedimentação das Hemácias: Utilidade e Limitações**. Revista da Associação Médica Brasileira. 46,3 (2000) ISSN 0104-4230.
- (16) MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S. - **Microbiologia Médica**. Elsevier Health Sciences Brazil. 2014. ISBN 978-85-352-7978-8.
- (17) MAHON, Connie; LEHMAN, Donald - **Diagnostic Microbiology**. Sixth Edit ed. ISBN 978-0-323-48218-9.
- (18) TRUANT, Allan L. - **Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology**. John Wiley & Sons, 2016.
- (19) WESTBLADE, L. F. (et al.) - **Multicenter Study Evaluating the Vitek MS System for Identification of Medically Important Yeasts**. Journal of Clinical Microbiology. 51,7 (2013) 2267-2272.
- (20) PINCUS, David H. - **Microbial Identification Using the BioMérieux Vitek® 2 System**. Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods. Bethesda, MD: Parenteral Drug Association, 2006, 1-32.
- (21) MASSON, Letícia Carrijo, et al.- **Diagnóstico laboratorial das infecções urinárias: relação entre a urocultura e o EAS**. Revista Brasileira de Análises Clínicas. 52.1 (2020) 77-81.
- (22) Awang, Mohd Syafiq et al.- **Advancement in Salmonella Detection Methods: From Conventional to Electrochemical-Based Sensing Detection**. Biosensors, (2021) doi:10.3390/bios11090346.
- (23) Czepiel, J., Drózdź, M., Pituch, H. et al- **Clostridium difficile Infection: review**. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 38 1211–1221 (2019). doi.org/10.1007/s10096-019-03539-6
- (24) FERNANDES, Sofia, et al. - **Protocolo de Parasitoses Intestinais**. Acta Pediátrica Portuguesa, 43,1 (2012) 35-41.
- (25) DE INSTRUÇÕES, Manual. **QuickStripe™ Adeno/Rota**. Diagnóstico, 7, 8.
- (26) SANTOS, João Rocha; GONÇALVES, Elisabete. **Rastreamento de Infecções Sexualmente Transmissíveis não víricas nos adolescentes: qual o estado da arte**. Nascer e Crescer, 25 (2016) 163-168.
- (27) Hughes VL, Hillier SL.- **Microbiologic Characteristics of Lactobacillus products used for Colonization of the Vagina**. Obstetrics and Gynecology, 75,2 (1990) 244-248.
- (28) - **Characteristics of Lactobacillus and Gardnerella vaginalis from women with or without bacterial vaginosis and their relationships in gnotobiotic mice**. Journal of Medical Microbiology, 61,8 (2012) 1074-1081.

- (29) HANSEN, S. M. [et al.] - **Dynamics of Streptococcus agalactiae Colonization in Women during and after Pregnancy and in Their Infants.** Journal of Clinical Microbiology , 42.1 (2004) 83-89.
- (30) Zoorob R, Sidani MA, Fremont RD, Kihlberg C. - **Antibiotic use in acute upper respiratory tract infections.** Am Fam Physician. (2012) 817-22.
- (31) ERS Task Force Report. - **Guidelines for management of adult community-acquired lower respiratory tract infections.** European Respiratory Society European Respiratory Journal, 1998, DOI: 10.1183/09031936.98.11040986.
- (32) DE SOUSA CHAVES, MIRISFRAN, et al. **RELAÇÃO ENTRE GIARDÍASE E ANEMIA EM CRIANÇAS: UMA REVISÃO DA LITERATURA.** Brazilian Journal of Surgery & Clinical Research, 23.2 (2018).
- (33) FIGUEIREDO, Izabela Rodrigues, et al. **Hepatite B Ccongênita: uma revisão.** Revista de Medicina e Saúde de Brasília, 5,2 (2016).