

Micael Santos Cravo

Relatório de Estágio em Análises Clínicas

Relatório de Estágio realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, Laboratório
Beatriz Godinho, Labeto SA., orientado pela Doutora Maria Beatriz Tomás e apresentado à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Junho 2012



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Agradecimentos

Agradeço à Professora Doutora Leonor Almeida, por todo o apoio prestado na realização deste trabalho. Além disso destaco a dedicação, compreensão e flexibilidade demonstradas, não só durante a realização do relatório, mas também durante todo o curso.

Agradeço à administração do Laboratório Labeto, S.A., com particular realce para a Doutora Maria Beatriz Tomaz por ter orientado o estágio e por ter possibilitado a realização deste. Também me parece legítimo deixar-lhe um reconhecimento pela disponibilização de informações imprescindíveis para a realização do relatório.

Agradeço a todos os colaboradores do Laboratório por terem contribuído com os seus conhecimentos técnicos e com a sua alargada experiência para a elaboração deste relatório.

Agradeço a todos os alunos do segundo ano do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, ano lectivo de 2011/2012, por todo o afecto, cooperação e companheirismo demonstrados ao longo da realização do mestrado.

Micael Cravo

Índice

Abreviaturas.....	9
Resumo	12
Abstract.....	13
Introdução	14
Caracterização do Laboratório de Estágio	15
Hematologia.....	17
Hemograma, Plaquetas e Reticulócitos	17
Metodologia e fundamentação dos equipamentos Hematológicos.....	17
Contador Hematológico: Sysmex XE-5000	17
Contador Hematológico: Advia 2120	20
Interpretação de histogramas.....	22
Anemias	24
Leucemias	24
Critérios de validação analítica.....	25
Reticulócitos	26
Estudo morfológico de sangue periférico	26
Pesquisa de siderócitos e de sideroblastos	26
Determinação da fragilidade globular.....	27
Velocidade de sedimentação	27
Hemoglobina glicada.....	28
Estudo de Hemoglobinopatias.....	29
Grupo Sanguíneo	31
Testes de Antiglobulina Directo e Indirecto.....	32
Estudo da Hemostase.....	33
Tempo de Protrombina.....	35
Tempo de Tromboplastina Parcial	35
Tempo de Trombina	35
Antitrombina III	36
Fibrinogénio	36
D-Dímeros.....	36
Microbiologia.....	39
Métodos de coloração.....	39

Meios de Cultura.....	39
Sistema Automatizado – Vitek.....	43
Análise microbiológica de produtos biológicos	44
Urina.....	44
Hemocultura	46
Aparelho Respiratório Superior.....	47
Aparelho Respiratório Inferior	49
Exsudado ocular	50
Exsudado auricular	52
Aparelho Gastrointestinal	52
Aparelho Genital	54
Exsudados purulentos	56
Dermatomicoses	56
Identificação de bactérias	57
Cocos Gram Positivos	57
Bacilos Gram negativos – Enterobacteriaceae.....	58
Bacilos Gram negativos não fermentativos.....	59
Cocobacilos Gram Negativos	60
Antibiograma ou TSA.....	61
Conclusão.....	63
Bibliografia.....	64

Índice de Tabelas

Tabela I – Metodologias dos contadores hematológicos.....	22
Tabela II – Principais alterações morfológicas.....	23
Tabela III – Causas de neutrofilia	23
Tabela IV – Causas de linfocitose.....	23
Tabela V – Causas de monocitose	24
Tabela VI – Classificação genérica das anemias em três grupos.....	24
Tabela VII – Classificação das leucemias	25
Tabela VIII – Classificação de LMA e LLA conforme grupo franco-americano-britânico (FAB).....	25
Tabela IX – Várias unidades para HbA1c e glicemias	29
Tabela X – Valores de referência HbA, HbF e HbA2.....	30
Tabela XI – Classificação de β -Talassemias	30
Tabela XII – α -Talassemias.....	31
Tabela XIII – Grupo sanguíneo sistema AB0	32
Tabela XIV – Grupo sanguíneo sistema Rh.....	32
Tabela XV – Aplicações TAD e TAI na prática clínica.....	33
Tabela XVI – Considerações a ter no controlo da terapia anticoagulante	37
Tabela XVII – Causas do prolongamento dos tempos Protrombina e Tromboplastina Parcial.....	38
Tabela XVIII – Meios de cultura utilizados na secção de Microbiologia.....	39
Tabela XIX – Critérios base para validação de uroculturas	45
Tabela XX – Número e intervalo entre as colheitas de hemoculturas.....	46
Tabela XXI – Meios a usar nos exsudados nasal, orofaríngeo e amigdalino	48
Tabela XXII – Flora normal do tracto respiratório superior e boca	49
Tabela XXIII – Classificação das amostras segundo a tabela de Murray e Washington.....	50
Tabela XXIV – Infecções oculares	51
Tabela XXV – Microrganismos causadores das infecções oculares	52
Tabela XXVI – Processamento laboratorial de fezes	53
Tabela XXVII – Exame microscópico	55

Tabela XXVIII – Exame cultural.....	55
Tabela XXIX – Relevância clínica das bactérias da família das <i>Enterobacteriaceae</i>	58
Tabela XXX – Exigência de factores de crescimento de bactérias do género <i>Haemophilus</i>	60
Tabela XXXI – Antimicrobianos.....	61
Tabela XXXII – Antibióticos na gravidez.....	62

Índice de Figuras

Figura nº1 – Contagem fluorescente de reticulócitos no XE-5000.....	19
Figura nº2 – Contagem de granulócitos imaturos.....	19
Figura nº3 – VGM em função CHGM	20
Figura nº4 – Gráfico obtido no aparelho HA-8160	29
Figura nº5 – Card com determinação do Grupo Sanguíneo.....	32
Figura nº6 – Colónias de E.coli, Proteus e Enterococcus.....	58

Abreviaturas

ABH – Precusores dos grupos sanguíneos

AEFA-Y-AEBM – Asociación Española de Farmacéuticos Analistas e Asociación Española de Biopatología Médica

AGH – Antiglobulinas humanas

AIDS – Acquired Immune Deficiency Syndrome

AIHA – Anemias hemolíticas autoimunes

AST-N093 – Carta de sensibilidade para Gram Negativos aeróbios (*Pseudomonas*)

AST-N113 – Carta de sensibilidade para Gram Negativos aeróbios (Ambulatório)

AST-N151 – Carta de sensibilidade para Gram Negativos aeróbios (Bactérias resistentes)

AST-P580 – Carta de sensibilidade para *Staphylococcus* spp, (*Enterococcus* spp e *S. agalactiae*)

AST-P586 – Carta de sensibilidade para *Enterococcus* spp e *S. agalactiae*

BK – Bacilo de Koch

CAM – Meio Campyloset

Candida CAN2 – Meio de cultura *Candida*

CHGM – Concentração de Hemoglobina Globular Média

CID – Coagulação Intravascular Disseminada

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI_s – Concentrações Mínimas Inibitórias

CO₂ – Dióxido de Carbono

COS – Gelose de Sangue

CPS – Meio cromogénico utilizado nas uroculturas

DNA – Desoxyribonucleic acid

DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crónica

EAC – Especialistas em Análises Clínicas

EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FAB – Grupo franco-americano-britânico

Factor Vw – Factor de von Willebrand

fL – Fentolitro

GME – Glicemia Média Estimada

GN – Identificação de Gram Negativos

GP – Identificação de Gram Positivos

H₂S – Ácido sulfídrico

HbA1c – Hemoglobina glicada

HbF – Hemoglobina Fetal
Htc – Hematócrito
HDF – Focagem hidrodinâmica
HFR – High fluorescence ratio
HGM – Hemoglobina Globular Média
HPLC – High-performance liquid chromatography
IFCC – International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
IFR – Fração de reticulócitos imaturos
IG – Granulócitos imaturos
IK – Índice de Katz
IL – Índice de lobularidade
INR – International Normalized Ratio
INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I. P
ISI – Índice de Sensibilidade Internacional
K₃EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético tripotássico
LFR – Low fluorescence ratio
LLA – Leucemia linfoblástica Aguda
LLC – Leucemia Linfocítica Crônica
LMA – Leucemia Mielóide Aguda
LMC – Leucemia Mielóide Crônica
LUC – Large unstained cells
Meio SS – Meio *Salmonella-Shigella*
MFR – Middle fluorescence ratio
MHS – Meio Mueller Hinton 2
MSA – Meio Chapman
NaCl – Cloreto de Sódio
NAD – Nicotinamida adenina dinucleótido
NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards
NGSP/DCCT – National Glycohemoglobin Standardization Program e Diabetes Control and Complications
NHI – Identificação de *Neisserias* e *Haemophilus*
PDF – Produtos de degradação da fibrina
PDW – Platelet Distribution Width
pg – picogramas
RDW – Red Cell Distribution Width

Rh – Rhesus
RNA – Ribonucleic acid
SLS-Hb – Surfactante Laurilsulfato de Sódio-Hemoglobina
STRB – Meio Chromid Strept B
TAC – Técnicos de Análises Clínicas
TAD – Teste de antiglobulina directo
TAI – Teste de antiglobulina indirecto
TF – Factor tecidular
TP – Tempo de Protrombina
t-PA – Activador de plasminogénio tecidular
TSA/ATB – Antibiograma
TSAC – Técnicos Superior em Análises Clínicas
TT – Tempo de Trombina
TTP/PTT – Tempo de Tromboplastina Parcial
UK-NEQAS – United Kingdom National External Quality Assessment Service
VCA3 – Gelose Chocolat + PoliViteX
VGM – Volume Globular Médio
VPM – Volume Plaquetário Médio
YST – Identificação de leveduras

Resumo

O relatório de estágio na área científica de Análises Clínicas demonstra as actividades desenvolvidas no Laboratório Labeto, S.A., sob a orientação da Doutora Maria Beatriz Tomaz e será apresentado à Faculdade de Farmácia. Estas envolveram diversas valências, entre elas estão a Imunologia, a Autoimunidade, a Endocrinologia, a Bioquímica, a Genética, a Hematologia e a Microbiologia, contudo, foram apenas duas as áreas seleccionadas para uma descrição mais pormenorizada, a Hematologia e a Microbiologia. Nestas áreas explicaram-se as metodologias utilizadas no laboratório e demonstrou-se a capacidade de interpretação dos resultados analíticos.

O estágio teve como principal objectivo a aplicação dos conhecimentos teóricos adquiridos durante o curso na prática clínica, bem como proporcionar ao mestrando o desenvolvimento de competências pessoais e profissionais. Durante a realização do mesmo foi possível perceber que o laboratório possui a mais avançada tecnologia e um corpo técnico extremamente qualificado.

Além disso, também permitiu a percepção do papel importante dos profissionais de Análises Clínicas, no âmbito do diagnóstico de doenças, na avaliação da efectividade de tratamentos, na monitorização e no controlo de terapêuticas.

Abstract

This report shows the activities in the Labeto, S.A., Laboratories, in the scientific area of Clinical Analysis, under the guidance of Dra. Maria Beatriz Tomaz and will be presented to the Faculty of Pharmacy. These involved various aspects, among them are Immunology, Autoimmunity to the Endocrinology, Biochemistry, Genetics, Microbiology and Hematology, however, only two areas were selected for a more detailed description, Hematology and Microbiology. In these areas were explained the methodologies used in the laboratory and were demonstrated the capacity to interpret the analytical results.

The stage had as main objective the application of theoretical knowledge acquired during the course in clinical practice as well as provide the graduate student to develop personal and professional skills. During the same, it was revealed that the laboratory has the most advanced technology and a highly qualified staff.

It also permitted the realization of the important role of Clinical Analysis of the professionals in the field of diagnosis of diseases, in evaluating the effectiveness of treatment, monitoring and peace in the control treatments.

Introdução

Este relatório de carácter profissional pretende fazer uma abordagem científica das Análises Clínicas, tendo em conta a aplicação prática dos conhecimentos teóricos adquiridos e assim percebendo o contexto real em que vivemos, numa perspetiva humana e económica.

A actividade profissional decorreu no Laboratório Labeto – Centro de Análises Bioquímicas, S.A., pertencente ao Grupo Beatriz Godinho, com sede na Avenida Marquês de Pombal, Leiria durante o ano lectivo 2011/12.

Este Laboratório possui um corpo técnico qualificado para executar as valências de Imunologia, Autoimunidade, Endocrinologia, Bioquímica, Genética, Hematologia e Microbiologia, sendo estas as duas últimas as selecionadas para aprofundamento teórico.

A equipa de colaboradores das secções de Hematologia do Labeto é formada pelos seguintes elementos: uma Especialista em Análises Clínicas (EAC), um Técnico Superior em Análises Clínicas (TSAC) e uma Técnica de Análises Clínicas (TAC). Na secção da Coagulação temos uma EAC. Estas equipas não são estáticas, assim sendo poderão existir variações. Facto que revela a importância da polivalência dos profissionais.

A equipa da secção de Microbiologia é constituída por uma TAC, uma Microbiologista e uma EAC.

Os serviços encontram-se completamente informatizados, possuindo uma rede de computadores com terminais ligados directamente aos aparelhos, o que possibilita a informatização dos serviços desde a abertura dos processos, com a devida atenção para os dados do paciente e para as análises requisitadas, até à emissão dos boletins de resultados. e-DeiaLab é o programa informático do laboratório.

O laboratório encontra-se apetrechado com sofisticado equipamento automatizado.

As metodologias a aplicar são escolhidas em função do desempenho exigido, de forma apropriada às condições do laboratório, e de acordo com o equipamento e reagentes.

Os equipamentos são preparados diariamente, no que respeita a reagentes, calibradores e controle, tendo em conta as recomendações do fabricante para cada aparelho.

Os programas utilizados para a avaliação externa da qualidade são o do INSA (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I. P), UK-NEQAS e AEFA-YAEBM. Além disto, é um laboratório certificado pela Norma NP EN ISO 9001:2008, das Normas dos Laboratórios Clínicos da Ordem dos Farmacêuticos e do Manual de Boas Práticas Laboratoriais.

Caracterização do Laboratório de Estágio

O laboratório Labeto, S.A., com sede em Leiria têm Direcção Técnica de Doutora Beatriz Godinho responsável máxima pelo laboratório como instituição, destaca-se com as funções de validação biopatológica e cooperação extrema em todas as situações dúbias que eventualmente possam ocorrer. Por vezes, estas competências são partilhadas por outros especialistas.

Uma das áreas seleccionada para a descrição mais detalhada foi a Hematologia. Sendo que esta no laboratório está dividida em duas secções: a Hematologia e a Coagulação. A estas secções do laboratório chegam vários tipos de tubos com amostras biológicas para proceder à respectiva análise. Dentro destes temos o tubo de EDTA tripotássico para contagens hematológicas e o tubo de Citrato de Sódio para hemostase.

Numa primeira fase procede-se à triagem das amostras, os tubos de citrato destinados às provas de coagulação são centrifugados a 2970 rpm durante 15 minutos e posteriormente, são distribuídos pelos vários sistemas automáticos.

Ao nível de competências deve salientar-se que à TAC cabe a triagem dos tubos contendo amostras, a sua distribuição para os sistemas automáticos. É também responsável pelas listas de trabalho, verificação dos produtos em falta e pelo funcionamento geral dos sistemas automáticos: Sysmex XE-5000 e Advia 2120 (hemogramas), Test I HL (velocidade de sedimentação), BCS XP (hemostase) e ADMS HA-8160 (hemoglobinas glicadas).

Ao TSAC e a EAC têm como funções a organização, coordenação da secção, tomar nota das ocorrências durante o trabalho e auxiliar a TAC quando necessário. No início do trabalho procede-se à avaliação dos resultados do controle de qualidade interno e, caso haja algum problema de carácter técnico contactar com os fornecedores para a sua resolução.

Após a saída dos resultados o Técnico Superior e a Especialista procedem à validação técnica e, no caso dos hemogramas, seleccionam as lâminas a corar, observam a morfologia de sangue periférico e corroboram o resultado obtido no aparelho. Em caso de dúvida na observação microscópica a última palavra cabe sempre à especialista.

Outra das áreas seleccionada para a descrição mais detalhada foi a Microbiologia. A esta secção do laboratório chegam vários tipos de produtos biológicos para proceder à respectiva análise. Área isolada das restantes áreas e com equipamento próprio, nomeadamente estufa de incubação com estudo de verificação de homogeneidade de temperatura a 37 °C, dispositivos para obtenção de atmosfera pobre em oxigénio, bicos de Bunsen e Câmara de Fluxo Laminar.

A TAC tem como responsabilidade a triagem, imprimir as listas de trabalho, proceder à organização das amostras, tratamento das amostras e sementeiras.

À Microbiologista cabe a função de avaliar as placas dos dias anteriores, realizar a técnica de identificações e antibiogramas no sistema Vitek 2, antibiogramas manuais e outros testes específicos e sua interpretação, observação ao microscópio dos exames a fresco e corados.

A EAC tem a responsabilidade de organizar e coordenar a secção, contacto com fornecedores para resolução de problemas técnicos. A especialista também pode auxiliar a Microbiologista nalgumas das suas funções. Por outro lado, também cabe a esta profissional a validação biopatológica de processos e contacto com os clínicos prescritores e doentes, tarefa dividida com as outras especialistas.

O fluxo de utentes neste laboratório é cerca de 900 utentes diários, dos quais são realizados aproximadamente 530 hemogramas e 130 uroculturas.

Hematologia

Hemograma, Plaquetas e Reticulócitos

A Hematologia de rotina é uma das áreas mais requisitadas pelos clínicos, podendo evidenciar-se as seguintes análises: **Hemograma, Plaquetas e Velocidade de Sedimentação**. Os resultados obtidos revestem-se de uma consideração razoável especialmente em conjugação com os resultados provenientes das restantes áreas.

Estas análises são realizadas em aparelhos automatizados, nomeadamente o Hemograma e as Plaquetas, em que se procede a uma distribuição equilibrada das amostras pelos seguintes aparelhos, Sysmex XE-5000 e Advia 2120. Os reticulócitos são quantificados no Sysmex XE-5000.

Metodologia e fundamentação dos equipamentos Hematológicos

Contador Hematológico: Sysmex XE-5000

Neste aparelho, tal como já foi dito previamente, são executados os seguintes pedidos: Hemograma, Plaquetas e Reticulócitos. Para isso, utilizam-se amostras de sangue total colhido em tubos de K₃EDTA.

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

- Canal HGB
- Canal RBC/PLT
- Canal 4DIFF
- Canal WBC/BASO
- Canal RET/PLT-O
- Canal IG

Canal HGB – Metodologia SLS-Hb

Esta metodologia permite determinar o valor de hemoglobina. O método SLS-Hb, tal como o nome indica, usa o Surfactante Laurilsulfato de Sódio (SLS), afastando o uso de cianeto. Após aspiração e diluição, a reacção ocorre pela seguinte ordem:

- 1- Hemólise de eritrócitos
- 2- Alteração da conformação da molécula globínica
- 3- Oxidação do ferro
- 4- Formação do complexo SLS-Hb

A quantificação é feita pela leitura da absorvância, pico a 535nm e do pico adjacente a 560nm.

Canal RBC/PLT – Método de detecção por Focagem Hidrodinâmica

O XE-5000 conta e detecta o tamanho dos eritrócitos e plaquetas usando o método da focagem hidrodinâmica (HDF). O objectivo da HDF é reduzir a perda e variação de pulsos devido à passagem não axial na zona de detecção e recirculação de células, os quais podem causar falsas contagens celulares.

Neste processo, as partículas estão sob uma ligeira pressão e são injectadas a partir da abertura formando uma coluna de partículas. Esta coluna é rodeada pelo diluente, submetendo a um alinhamento partícula a partícula e, servindo, assim, de guia para a passagem das mesmas pelo orifício e subsequentemente pelo tubo de captura.

Neste canal obtém-se a contagem de eritrócitos, plaquetas, o VGM e o VPM.

Canais 4DIFF, WBC/BASO e RET/PLT-O – Citometria de fluxo por laser semiconductor

O laser semiconductor ilumina a amostra e separa as células de acordo com os seus sinais:

- *Forward scatter* – esta intensidade luminosa indica o volume celular
- *Side scatter* – dá a informação do conteúdo celular, como o núcleo e grânulos
- *Side fluorescence* – indica a quantidade de DNA e RNA celulares

Canal 4DIFF

O surfactante provoca lise e colapso dos eritrócitos e plaquetas e possibilita a abertura de poros nas membranas dos leucócitos. A seguir, o corante Polimetina migra para dentro dos leucócitos danificados e liga-se aos ácidos nucleicos e organitos citoplasmáticos. Quando expostos à luz laser a 633nm, a intensidade de fluorescência é directamente proporcional ao conteúdo de ácido nucleico. De seguida, um ácido orgânico liga-se especificamente aos grânulos dos eosinófilos, possibilitando a sua diferenciação dos neutrófilos através dum sinal superior de *side scatter*. Posteriormente, o aparelho diferencia os leucócitos em 4 tipos: neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos.

Canal WBC/BASO

Neste canal, o Sysmex XE-5000 usa os sinais *forward* e *side scatter*. Um reagente ácido provoca uma lise fazendo diminuir os eritrócitos e plaquetas e reduz os leucócitos a simples núcleos, com excepção dos basófilos, e assim, permitindo a contagem do número total de Leucócitos e a contagem de Basófilos.

A redução de tamanho dos eritrócitos e plaquetas e a passagem dos leucócitos (com exceção dos basófilos) a simples núcleos é também feita por um surfactante. As diferenças volumétricas resultantes entre os basófilos e as restantes células são analisadas a partir das informações provindas dos feixes *forward scatter* e *side scatter*. Os dois feixes fazem também a diferenciação entre as células de tamanho menor anucleadas e as células nucleadas.

Canal RET/PLT-O

Neste canal, os ácidos nucleicos dos leucócitos e eritrócitos nucleados são corados, sendo contados através dos feixes *forward scatter* e *side scatter*. As células nucleadas são divididas em 3 graus, de acordo com a sua fluorescência:

- LFR – rácio de fluorescência baixo (*Low fluorescence ratio*) – eritrócitos
- MFR – rácio de fluorescência médio (*Middle fluorescence ratio*) – reticulócitos
- HFR – rácio de fluorescência alto (*High fluorescence ratio*) – leucócitos

O somatório da contagem MFR e HFR é apresentado como o rácio de reticulócitos imaturos (IFR). A contagem óptica de plaquetas também é aqui realizada, permitindo corrigir a contagem quando na presença de plaquetas gigantes e/ou eritrócitos macrocíticos.

Este canal utiliza 2 corantes. Estes penetram nas membranas celulares corando o RNA dos reticulócitos e o RNA/DNA das células nucleadas. Os reticulócitos são separados dos eritrócitos através da diferença de conteúdo em RNA e, separados das restantes células nucleadas, através das diferenças em conteúdo de DNA/RNA. Já que as células nucleadas, tais como os leucócitos e eritroblastos e eritrócitos com inclusões de Howell-Jolly, têm uma elevada intensidade de fluorescência, os reticulócitos, de intensidade de fluorescência mais reduzida, são detectados facilmente permitindo desta forma uma contagem fiável destes. (1)

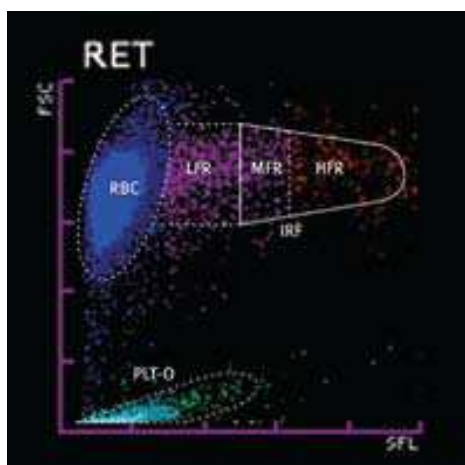


Figura nº1 – Contagem fluorescente de reticulócitos no XE-5000

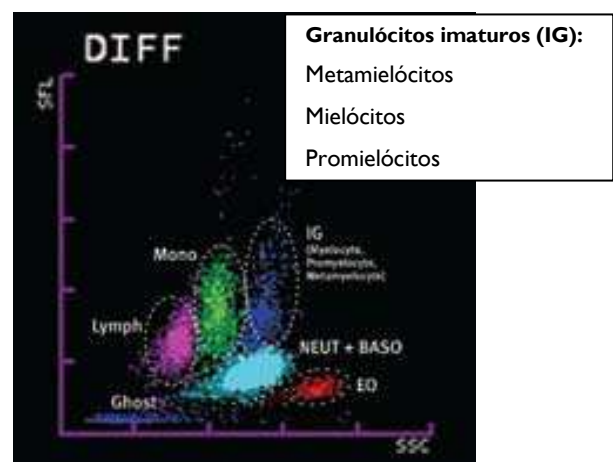


Figura nº2 – Contagem de granulócitos imaturos

Contador Hematológico: Advia 2120

Dispersão de luz

O Advia 2120 faz contagem e medição de células por este método e usa luz branca para os leucócitos e laser para os eritrócitos e as plaquetas. Os eritrócitos são convertidos de modo isovolumétrico em esferas, de modo que a dispersão da luz torna-se independente da forma da célula, e pode ser enunciada por leis físicas. As células passam por um raio laser e a luz dispersada frontalmente é medida num ângulo estreito (2 a 3°) e um mais largo (5 a 15°). A comparação de ambas permite a determinação do tamanho e da concentração de hemoglobina das células uma a uma. São fornecidos histogramas da distribuição por volume e por concentração hemoglobínica, além dum gráfico no qual o volume aparece nas ordenadas e a concentração de hemoglobina nas abcissas. O histograma do volume celular permite a dedução do VGM, do RDW e do Htc. Desta forma, o histograma das concentrações de hemoglobina permite deduzir a média das concentrações globulares de hemoglobina.

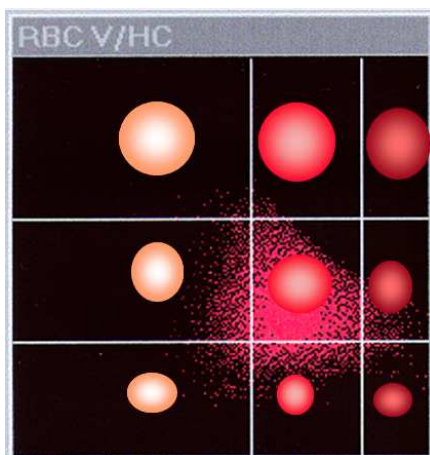


Figura n°3 – VGM em função da CHGM

Cianometahemoglobina – Metodologia Convencional Modificada

Determina a Hemoglobina (Hb). A HGM e a CHGM são calculadas a partir da Hb, da contagem de eritrócitos e do VGM. Como opcional temos o doseamento de hemoglobina pelo método Laurilsulfato. Assim sendo, são realizadas duas determinações independentes da CHGM, mas ambas representam a concentração média de hemoglobina na célula. Devem fornecer o mesmo resultado. Isto serve de controlo de qualidade interno.

O aparelho produz determinações exactas de VGM, Htc e CHGM, concordantes com os métodos de referência, contudo, não são medidas com exactidão as formas que não podem ser convertidas em esferas isovolumétricas, como por exemplo as células falciformes irreversíveis. Medidas similares de dispersão da luz em dois ângulos permitem contar e medir as plaquetas (VPM). Também são calculados o plaquetócrito e o PDW, uma medida da

anisocitose plaquetária. A contagem por essa tecnologia parece melhor em casos de trombocitopenia.

A contagem diferencial do Advia deriva de dois canais:

- Canal peroxidase
- Canal basófilo/lobularidade

Canal Peroxidase

Este canal utiliza a luz branca e incorpora uma **reação citoquímica** na qual a **peroxidase** dos neutrófilos, dos eosinófilos e dos monócitos age sobre um substrato, o 4-cloro-1-naftol, produzindo um produto de reação negro, que absorve luz. Neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos dividem-se em quatro aglomerados. Há outro aglomerado de células peroxidase-negativas e maiores do que a maioria dos linfócitos “células grandes não coradas” (*LUC large unstained cells*). Em pessoas saudáveis, as LUC são principalmente linfócitos grandes, mas células anormais, como blastos e linfócitos atípicos, podem cair nesta categoria.

Canal basófilo/lobularidade

Neste canal independente, os basófilos são distinguidos dos outros leucócitos, pela resistência à perda do citoplasma com um agente lítico em meio ácido. Os basófilos, medidos por dispersão frontal da luz, são maiores do que os resíduos sem citoplasma das demais células. Também se utiliza o canal basófilo/lobularidade para detectar a presença de blastos. A dispersão frontal da luz é proporcional ao tamanho celular. A dispersão da luz em ângulo grande é a medida da densidade nuclear e da lobulação. Os blastos são detectados como uma população com uma densidade nuclear anormalmente baixa. Além disso, o “índice de lobularidade” (IL) é uma determinação da relação entre o número de células que produzem muita dispersão da luz em ângulo grande (neutrófilos lobulados) e as células que produzem menos dispersão da luz em ângulo grande (células mononucleares, granulócitos imaturos e blastos).

O equipamento além de “alarmes” para a presença de blastos, linfócitos atípicos, granulócitos e eritroblastos possui o índice médio de peroxidase. Este último é uma medida da actividade média da peroxidase, a qual está diminuída na deficiência genética de peroxidase, como a que ocorre nalguns síndromes mielodisplásicos e leucemias mielóides. Também há uma diminuição na grávida. Este parâmetro está aumentado nas infecções, nalguns síndromes mielodisplásicos e leucemias mielóides, na AIDS e na anemia megaloblástica. (1)

Tabela I – Metodologias dos contadores hematológicos

Comparação – Metodologias		
	Sysmex XE-5000	Advia 2120
Hemoglobina	Colorimetria Surfactante Laurilsulfato de Sódio	Colorimetria e Citometria de fluxo (metodologia convencional da cianometahemoglobina)
Eritrócitos	Citometria de fluxo com focagem hidrodinâmica	Citometria de fluxo com dispersão em 2 ângulos
Hematócrito	Citometria de fluxo com focagem hidrodinâmica	Cálculo
VGM	Cálculo	Citometria de fluxo com dispersão em 2 ângulos
Leucócitos	Citometria de fluxo com dispersão lateral da luz, dispersão frontal e intensidade de fluorescência	Citometria de fluxo combinada com citoquímica peroxidase
Plaquetas	Citometria de fluxo com focagem hidrodinâmica	Citometria de fluxo com dispersão em 2 ângulos (Método óptico)

Interpretação de histogramas

O resultado de um pedido do hemograma é composto por: Eritrograma e Leucograma.

Na linha inferior temos os alarmes (*flags*), os quais nos permitem chamar a atenção para resultados fora dos valores de referência ou com alterações nos histogramas que evidenciam possíveis alterações morfológicas. A continuação do estudo do hemograma é feita, geralmente, através da observação de esfregaço de sangue periférico e por interacção com resultados obtidos noutras secções, nomeadamente na bioquímica.

Os **índices hematimétricos** são comuns aos dois aparelhos hematológicos:

- **HGM= Hb/eritrócitos** – é a quantidade de hemoglobina num dado volume de eritrócitos (em pg).
- **Htc=VGM*eritrócitos** – é a proporção do volume sanguíneo ocupada pelos eritrócitos (em %).
- **CHGM=Hb/Htc** – é a concentração de Hb por unidade de volume. Indica-nos o teor de Hb, se os eritrócitos têm ou não o conteúdo normal (em g/dL).
- **RDW** – permite detectar anomalias relacionadas com a anisocitose.

Tabela II – Principais alterações morfológicas

Anisocitose	Poiquilocitose
Aumento da variação do tamanho (eritrócito normal, micrócito e macrócito)	Aumento da variação da forma (célula em alvo, esferócito, ovalócito/eliptócito, estomatócito)

Por outro lado, a análise frequente dos leucócitos permite ao clínico uma orientação terapêutica baseada nos dados encontrados no exame clínico. Quaisquer valores acima do valor de referência $4 \text{ a } 8 \times 10^9/\text{L}$ traduzem uma situação de leucocitose, enquanto valores abaixo significam que estamos perante uma leucopenia, o que é característico de alguns tipos de leucemias e aplasias.

Quaisquer situações de traumatismo e infecções levam geralmente a leucocitose. Um factor muito importante na leucocitose é a distinção entre uma reacção leucemóide e leucemia mielocítica crónica: no caso da segunda, a mesma caracteriza-se, como qualquer outra leucemia, pela proliferação monoclonal da linha mieloide, ou seja, a linhagem mieloide deve estar aumentada, no hemograma. Se não houver aumento de pelo menos um dos tipos de leucócitos, então estamos perante a primeira situação, que se caracteriza por uma reactividade e leucocitose excessiva, com presença de células imaturas no sangue periférico que ocorre sobretudo em crianças. (2)

➤ **Neutrófilos** – são células com o núcleo multilobulado (3 a 5 lóbulos) e possuem grânulos primários e secundários.

Tabela III – Causas de neutrofilia

Neutrofilia – Aumento do nº de Neutrófilos
Infecções bacterianas, Doentes politraumatizados, Doenças metabólicas, Tratamento com corticosteroides, Leucemia mielóide crónica

Abaixo dos valores considerados normais traduzem neutropenias características de doentes com infecções em antibioterapia ou mesmo infecções fulminantes.

➤ **Linfócitos** – têm uma grande variabilidade em termos de tamanho e morfologia e podem classificar-se em linfócitos T ou linfócitos B. são, no entanto, células mononucleares que podem ou não ter grânulos. Valores abaixo do limite designam-se de linfopenias. (2)

Tabela IV – Causas de linfocitose

Linfocitose – Aumento do nº de Linfócitos
Infecções (Mononucleose Infecciosa, Sífilis, Brucelose) ou Síndromas linfoproliferativos.

Em indivíduos adultos saudáveis a fórmula leucocitária neutrófilos/linfócitos é >1 . Nas crianças é o oposto: neutrófilos/linfócitos <1 .

Podemos ter linfocitoses relativas que cursam com linfopenias absolutas – nos casos de leucopenias, o número de leucócitos está baixo e quando calculamos a valor relativo de linfócitos, mesmo que estes estejam em número normal, teremos linfocitose. Em caso de células maduras não é importante o cálculo dos valores relativos, pois podem induzir em erro.

- **Monócitos** – são células grandes, geralmente vacuoladas, que possuem um só núcleo reniforme. A sua função por excelência é a fagocitose e apresentação de antígenos aos linfócitos T.

Tabela V – Causas de monocitose

Monocitose – Aumento do nº de Monócitos
Infecções bacterianas, Infecções por protozoários, Leucemia mielomonocítica crónica

- **Eosinófilos** – Eosinofilias são frequentes em alergias, asma e também em parasitoses.
- **Basófilos** – Basofilias traduzem processos alérgicos, já que os seus grânulos são muito ricos em histamina. (2)

Anemias

Muitos são os casos que aparecem no laboratório de **anemia** (abaixamento do valor de hemoglobina e/ou número de eritrócitos). (2)

Tabela VI – Classificação genérica das anemias em três grupos

Microcítica, hipocrômica	Normocítica, normocrômica	Macrocítica	
VGM < 80 fL HGM ≤ 27 pg	VGM e HGM dentro dos valores de referência	VGM > 100 fL	
Anemia Sideropénica Anemia Sideroblástica Anemia da Intoxicação pelo Chumbo Anemia das Doenças Crónicas Talassemias	Hemorragia aguda, Anemia das Doenças Crónicas (Doença renal crónica) Anemias Hemolíticas e Hiperesplenismo Anemia na Insuficiência renal deve-se à diminuição da produção de eritropoietina e à diminuição da semi-vida dos eritrócitos.	Anemia Megaloblástica: Défice de vitamina B12, Défice de folatos, Anomalias no metabolismo da Vit. B12 ou folatos, Defeitos na síntese do DNA	Anemia não Megaloblástica: Consumo de álcool, Doença Hepática, Mielodisplasia Anemia Aplástica

Leucemias

As **leucemias** são um grupo de patologias que agridem a medula óssea e que se caracterizam pela proliferação medular anárquica de leucócitos malignos, progressiva no tempo e no espaço. Pode atingir as linhagens mielóides (eritrócitos, granulócitos e

plaquetas), ou a linhagem linfóide, alterando o sangue periférico, ainda que tais células neoplásicas possam não ser encontradas neste. É um cancro agressivo e muitas vezes fatal.

Nas formas agudas predominam as células imaturas (blastos), e nas formas crónicas predominam as células maduras.

Tabela VII – Classificação das leucemias

Linhagem	Agudas	Crónicas
Mielóide/Granulocítica	Leucemia mielóide aguda (LMA) ou Leucemia mieloblástica	Leucemia mielóide crónica (LMC)
Linfóide	Leucemia linfocítica aguda ou Leucemia linfoblástica aguda (LLA)	Leucemia linfocítica crónica (LLC)
Megacariócitos	Leucemia de células megacariocíticas	Trombocitemia
Eritróide	Eritroleucemia aguda	Policitemia Vera

(2)

Tabela VIII – Classificação de LMA e LLA conforme grupo franco-americano-britânico (FAB)

LMA	LLA
M0 – indiferenciada	L1 – com blastos pequenos, uniformes, relação núcleo-citoplasma alta
M1 – sem maturação ou com maturação escassa, sendo o predomínio dessa maturação para a linha granulócito/neutrófilo.	L2 – com blastos maiores, heterogéneos, relação núcleo-citoplasma mais baixa
M2 – LMA com maturação para a linha granulócito/neutrófilo.	L3 – com blastos vacuolizados, citoplasma basófilo
M3 - LMA promielocítica	
M4 - LMA mielomonocítica	
M5 – LMA com maturação para a linha monocítica	
M6 - Eritroleucemia	
M7 – Leucemia aguda megacarioblástica	

(2)

Critérios de validação analítica

Nalgumas situações, o resultado pode ser validado, sem recorrer ao esfregaço de sangue periférico, contudo, existem casos em que se deve observar a lâmina:

- Plaquetas inferiores a $100 \times 10^3/L$, nos casos em que plaquetas $<50 \times 10^3/L$ sem histórico ou informação pedir nova colheita em EDTA e citrato para confirmação;
- Hemoglobina $<10 \text{ mg/dl}$;

- Sempre que haja alterações no hemograma (constantes, informação dada pelo equipamento) e que se ache necessário analisar.

Reticulócitos

A contagem de reticulócitos é o exame mais simples e directo para avaliar a taxa efectiva de produção dos eritrócitos. O número de reticulócitos no sangue periférico reflecte a actividade eritropoiética medular, partindo do princípio que há uma libertação normal dos reticulócitos da medula, e que estes permanecem em circulação o período de tempo normal. Quando se estuda uma anemia e a sua provável etiologia, a contagem de reticulócitos é um exame de 1ª linha, a par das constantes globulares e do estudo morfológico dos eritrócitos. Permite diagnosticar se se trata de uma anemia regenerativa, em que há estimulação da medula e há uma resposta medular com aumento do número de reticulócitos e consequente aumento da produção de eritrócitos, ou de uma anemia arregenerativa, em que há um defeito na produção dos eritrócitos e não há um aumento do número de reticulócitos. (3) (4)

Estudo morfológico de sangue periférico

Esta coloração é utilizada para corar os esfregaços de sangue periférico. As lâminas são coradas para observação em 4 situações:

- A pedido do clínico
- Confirmação de resultados do hemograma
- Pesquisa de hematozoários (para uma contagem de parasitemia e definição da espécie do parasita)
- Pesquisa de eosinófilos no exsudado nasal

A técnica utilizada é *Hemacolor*, de acordo com o manual do equipamento Mirastainer II, é uma coloração de sangue baseada na coloração de Giemsa. Este é um corante neutro derivado do corante primitivo de Romanowsky. O núcleo das células toma as cores básicas (solução de tiazina) e os elementos citoplasmáticos as ácidas (da eosina). Este método permite diferenciar as várias morfologias das células hematopoiéticas.

Pesquisa de siderócitos e de sideroblastos

Na detecção de siderócitos e de sideroblastos é usado um método de coloração. Baseia-se na reacção do Azul da Prússia, também denominada por reacção de Perls, em que o ácido ferrocianídrico reage com o ião Fe^{3+} . Há formação de um precipitado de cor azul intenso, designado Azul da Prússia, em forma de grânulos – os grânulos sideróticos.

Importantes nas anemias sideroblásticas que podem ser de causa hereditária ou adquirida (álcool). Este procedimento aplica-se a amostras de sangue periférico e/ou de medula óssea.

(1) (5) (6)

Calcular a percentagem de siderócitos/sideroblastos:

% Siderócitos ou Sideroblastos= (Siderócitos ou Sideroblastos X 100) / eritrócitos

Determinação da fragilidade globular

Os eritrócitos são expostos a um gradiente hipotónico de cloreto de sódio, determinando-se os índices de resistência das células a concentrações salinas hipotónicas. Os valores da resistência globular são expressos em percentagem (correspondente à concentração de NaCl). As resistências mínima e máxima correspondem às concentrações de NaCl dos tubos onde a hemólise começa e onde é total, respectivamente. Este método permite uma avaliação clínica sobre o estado de anemia hemolítica. A Esferocitose Hereditária apresenta resistência osmótica aumentada dos eritrócitos, ou seja, os eritrócitos lisam para maiores concentrações de NaCl. Pelo contrário, a Eliptocitose Hereditária apresenta fragilidade osmótica normal ou ligeiramente diminuída. (5) (7)

Velocidade de sedimentação

Os valores da velocidade de sedimentação (VS) são uma medição genérica não específica de estados inflamatórios e de infecção. O aumento da velocidade de sedimentação pode ocorrer em infecções, necrose tecidular, doenças reumáticas, leucemias, neoplasias, mielomas, anemias e gravidez. A sua diminuição verifica-se nas poliglobulias, hipofibrinogenemia e anomalias da forma dos eritrócitos. (5)

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

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

A determinação da velocidade de sedimentação consiste em medir a velocidade de separação entre os eritrócitos e o plasma em sangue total não coagulado (K₃EDTA).

Após agitação, a amostra é automaticamente transferida para um capilar mantido a 37°C. O dispositivo usa feixes infra-vermelhos com um comprimento de onda 950nm que atravessam o capilar. O detector de fotodíodo detecta o feixe exterior e regista o sinal por um período de tempo fixo, o que permite a construção da curva de sedimentação para cada

amostra. Através de um modelo de regressão linear, o sinal é transformado num valor comparável com os valores de Westegren. (8)

Se for pedido Índice de Katz (IK) pelo clínico calcular através da seguinte fórmula:

$$\mathbf{IK = (valor\ 1^{a}hora + metade\ do\ valor\ 2^{a}hora) / 2}$$

Hemoglobina glicada

O doseamento da Hemoglobina Glicada (HbA1c) é incluído nesta parte do relatório, uma vez que o mesmo é realizado na secção de Hematologia. Isto deve-se ao facto de a amostra ser a mesma das técnicas hematológicas (K₃EDTA), e o aparelho de HPLC utilizado servir também para o doseamento da Hemoglobina A₂ e Hemoglobina F.

A HbA1c é determinada por rotina em todas as pessoas com Diabetes Mellitus para avaliar o grau de controlo glicémico. Deve ser tido em conta que o seu valor pode ser alterado por outros fatores além da glicose (hemoglobinopatias, situações de elevado turnover eritrocitário). (9)

A formação de Hemoglobina Glicada é irreversível, e o nível no sangue depende do tempo de vida do eritrócito (média de 120 dias) e da concentração de glucose no sangue.

A hemoglobina Glicada é formada por ligação da glucose com a porção N-terminal da valina de cada cadeia da Hemoglobina A, resultando numa base de Schiff instável. Posteriormente sofre um rearranjo de Amadori formando a HbA1c. (9)

Para a realização deste doseamento é usada a Cromatografia Líquida de Alta Pressão. Este tipo de cromatografia usa uma coluna composta por resina de troca iónica de carácter catiónico de fase reversa. (9) Assim, nestes comprimentos de onda podemos obter as seguintes fracções: HbA1c, HbA1, HbF, HbA2 e hemoglobinas variantes.

Interpretação dos resultados

Os resultados devem ser apresentados nas unidades mmol/mol, indicadas pela International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) and Laboratory Medicine, bem como em percentagem, segundo National Glycohemoglobin Standardization Program e Diabetes Control and Complications (NGSP/DCCT), e referida a glicemia média estimada, obtida por cálculo a partir do valor da HbA1c, em percentagem. Tomados como exemplo os valores de 5 e 7% de HbA1c. (10)

Tabela IX – Várias unidades para HbA1c e glicemias

HbA1c		Glicemia Média Estimada (GME)	
NGSP/DCCT	IFCC	Sistema Convencional	Sistema Internacional (SI)
5%	31 mmol/mol	97 mg/dL	5.4 mmol/L
7%	53 mmol/mol	154 mg/dL	8.6 mmol/L

(11)

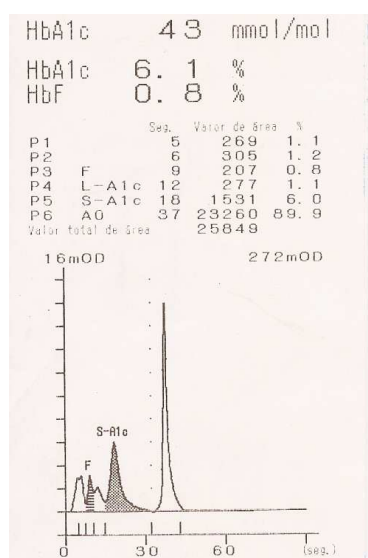
Equação de conversão de unidades IFCC para NGSP/DCCT da HbA1c:

$$\text{HbA1c (\%)} = 0.09148 \times \text{HbA1c (mmol/mol)} + 2.152$$

Equações de cálculo da GME a partir dos valores da HbA1c em %:

$$\text{GME em mg/dL} = 28.7 \times \text{HbA1c (\%)} - 46.7$$

$$\text{GME em mmol/L} = 1.59 \times \text{HbA1c (\%)} - 2.59$$



HbA1c 6.1%, 43 mmol/mol.

HbF 0.8%

Figura nº4 – Gráfico obtido no aparelho HA-8160

Caso tenhamos uma hemoglobina variante essa informação tem de ser mencionada no resultado, isto é, quando se detecta uma % HbF, HbA2, fora dos limites normais ou presença de variante(s) de hemoglobina será mencionado no boletim de resultados.

Estudo de Hemoglobinopatias

Este estudo poderá ser feito pelo doseamento das hemoglobinas A₂ e F. O aparelho utilizado é o mesmo que no doseamento da HbA1c, logo o método está descrito nesse capítulo. Esta técnica auxilia no diagnóstico da hemoglobinopatia, sendo que posteriormente deverão ser feitas outras técnicas até mesmo no sentido de proporcionar um aconselhamento genético, pois indivíduos portadores, muitos deles assintomáticos poderão ter filhos com sintomas mais severos, se o cônjuge for também portador.

Interpretação dos resultados

Tabela X – Valores de referência HbA, HbF e HbA2

HbA	95-98%
HbF	1.5-3.5%
HbA2	<2%

(2)

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

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

Para determinar a HbA faz-se o seguinte cálculo:

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

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

Tabela XI – Classificação de β -Talassemias

β-Talassemia Minor	Heterozigotia, Anemia ligeira, hipocrómica e microcítica e Hb A2 elevada (>3,5%)
β-Talassemia Intermédia	Homozigotia ou dupla heterozigotia (β +/ β +), Anemia hipocrómica e microcítica, HbA2>3,5% e HbF 10-60%
β-Talassemia Major	Ausência de síntese de cadeias (β 0/ β 0), Anemia severa, dependente de transfusões desde o 1º ano de vida, Não há HbA e HbF elevada

β 0 (ausência de cadeias), β + (redução da quantidade de cadeias) (2)

Tabela XII – α -Talassemias

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

Delecção dos genes cadeias alfa (2)

Caso haja pico na área da HbS tem de se fazer prova da solubilidade HbS (Kit) ou prova de falciformação. A prova de falciformação consiste na transformação de eritrócitos em drepanócitos na presença de um abaixamento da concentração de oxigénio. O grau e a rapidez do aparecimento destas formas vão depender da concentração da HbS. Esta variante da hemoglobina encontra-se na drepanocitose que é uma doença qualitativa resultante da alteração da estrutura da cadeia globínica (troca de ácido glutâmico por valina na 6^a posição), em que o eritrócito adquire a forma de foice. A HbS produz uma redução da oxigenação. O indivíduo heterozigótico (portador da mutação) é praticamente assintomático, enquanto o homozigótico apresenta uma anemia hemolítica crónica com gravidade variável que pode incluir vasooclusões, maior risco de acidente vascular cerebral, necrose da cabeça do fémur e húmero, úlceras nas pernas e infecções pulmonares. (2) (13)

Grupo Sanguíneo

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

A Grupagem AB0 é um dos parâmetros de maior importância dentro da Imunohematologia, tendo implicações a nível de transfusões e de transplantação. Os antígenos AB0 são expressos a nível da membrana eritrocitária, endotelial e epitelial, desempenhando um papel muito importante como antígenos de histocompatibilidade.

A determinação dos grupos sanguíneos AB0 e Rh tem por base, pois, a reacção de aglutinação. Esta prova é altamente específica e bastante sensível, sendo um valioso instrumento de pesquisa e um meio útil de diagnóstico. Em caso de transfusões sanguíneas, os antígenos do grupo AB0 são bastante importantes. O sucesso de uma transfusão sanguínea depende pois, da compatibilidade entre o sangue do dador e o sangue do receptor. (14)

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

O antígeno D (Sistema Rh) é extremamente imunogénico, uma vez que leva à produção de anti-D na maior parte dos indivíduos Rh- (não possuem o antígeno D), sendo este produzido por exposição ao antígeno D em resultado de uma transfusão ou gravidez.

Quando uma grávida Rh- dá à luz um filho Rh+, a mãe irá produzir anticorpos anti-D. Diz-se que é uma grávida imunizada. Caso ocorra uma segunda gravidez e o feto seja Rh+, os anticorpos sensibilizados da mãe vão atravessar a placenta e hemolizar os eritrócitos do feto. Actualmente, este problema encontra-se ultrapassado uma vez que se administra à mãe, uma imunoglobulina anti-D. (14) (15)

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

Interpretação dos resultados

Positivo: Os eritrócitos aglutinados formam uma linha vermelha à superfície do gel ou aglutinados dispersos no gel.

Negativo: Aglutinação de eritrócitos no fundo do microtubo.

Tabela XIII – Grupo sanguíneo sistema AB0

Reacções dos Grupos Sanguíneos AB0			
Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Grupo Sanguíneo
+++	Negativo	+++	A
Negativo	Negativo	+++	B
+++	+++	+++	AB
Negativo	Negativo	Negativo	0

Tabela XIV – Grupo sanguíneo sistema Rh

Reacções para RhD	
RhD positivo	Rh negativo
+++	Negativo



B+

Figura nº5 – Card com determinação do Grupo Sanguíneo

Testes de Antiglobulina Directo e Indirecto

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

O teste de antiglobulina (Coombs) é um dos principais testes serológicos imuno-hematológicos para detectar os anticorpos capazes de se ligar ao seu antígeno homólogo eritrocitário, mas não produzem aglutinação. (14)

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

O TAD (teste de antiglobulina directo) tem como objectivo detectar se os eritrócitos estão revestidos *in vivo* com imunoglobulina e/ou complemento. O TAI (teste de antiglobulina indirecto) tem como objectivo a pesquisa no soro de anticorpos incompletos.

A técnica utilizada é a técnica em gel (cards) que contém antiglobulina humana (AGH) poli-específica.

A função mais importante do reagente de AGH poli-específica consiste em detectar a presença de IgG. A importância do anti-complemento no reagente AGH é discutível, visto que os anticorpos que apenas são detectáveis pela sua capacidade de se unirem ao complemento são bastante raros. No entanto, a actividade de anti-C3d é importante para o TAD na investigação de anemias hemolíticas autoimunes (AIHA). (16)

Tabela XV – Aplicações TAD e TAI na prática clínica

Aplicações	
TAD	TAI
Doença Hemolítica Peri-Natal	Pesquisa e identificação de anticorpos irregulares
Anemia Hemolítica Auto-Imune	Provas de Compatibilidade Pré- Transfusionais
Hemólise induzida por drogas	Imunização feto-maternal
Reacções Hemolíticas Pós-Transfusionais	Imunização pós-transfusional

Estudo da Hemostase

A hemostase é um conjunto de mecanismos que, de modo integrado, contribuem para parar rapidamente a hemorragia, actuando localmente e de modo auto-limitado, com o intuito de não comprometer o fluxo sanguíneo normal. Deficiências na hemostase resultam em hemorragia e a incapacidade de manter a fluidez leva à trombose.

Quando há lesão de um vaso, ocorrem várias etapas de modo a estancar a hemorragia: vasoconstrição, abrandando o fluxo sanguíneo; hemostase primária, em que as plaquetas se ligam ao colagénio das paredes do vaso exposto, pelo factor de von Willebrand (factor vW), de modo a formar uma “rolha” plaquetária, induzindo-as a libertar substâncias que levam à activação das plaquetas e secretando tromboxano A₂ que estimula a agregação de mais plaquetas; hemostase secundária ou coagulação, que envolve uma complexa cascata

dos factores de coagulação, resultando na transformação de fibrinogénio em fibrina, formando assim um coágulo; fibrinólise, que consiste na dissolução desse coágulo.

A cascata de coagulação é uma activação sequencial de proenzimas que culminam com a formação de trombina, que vai converter o fibrinogénio (proteína solúvel no plasma) em fibrina (proteína fibrosa insolúvel). Há duas vias para a formação de trombina: via intrínseca e via extrínseca.

A activação da via intrínseca dá-se pelo contacto das proteínas plasmáticas circulantes (factor XII) que se tornam activadas pela exposição a superfícies estranhas ou ao endotélio vascular e tecidos danificados. O factor XIIa é auxiliado por um cofactor, quinogénio de alto peso molecular, que converte a pré-caliceína em caliceína, que por sua vez potencia a activação do factor XII (sistema de auto-amplificação). O factor XI é convertido na sua forma activa pelo factor XIIa juntamente com o quinogénio. O factor XIa activa o factor IX e o factor IXa, juntamente com o factor tecidual (TF) libertado pelas plaquetas estimuladas, reage com o factor VIII para produzir o complexo activador X. (2)

A via extrínseca é estimulada pelos factores tecidulares libertados dos tecidos lesados, nomeadamente o TF. O TF converte o factor VII em factor VIIa, que interfere directamente com o factor X.

Ambas as vias convergem para formar a via comum, que activa a proteína plasmática protrombina (II) em trombina (IIa). A reacção do factor Xa com a protrombina requer iões de cálcio e fosfolípidos e é marcadamente potencializada pela associação com o factor V. O fibrinogénio transforma-se em fibrina, constituindo um coágulo grande mas frágil. A polimerização irreversível ocorre quando o factor XIIIa induz ligações cruzadas nas ligações peptídicas. (2)

Para avaliar a coagulação, realizam-se testes de screening em que se mede o tempo que uma amostra demora a coagular, ou seja, a formar fibrina, avaliando assim se há défice de algum factor. Quando os testes de screening indicam que pode existir um défice da coagulação, a concentração dos factores da coagulação deve ser avaliada. Esta avaliação permite estabelecer o diagnóstico da deficiência, o grau de severidade, monitorizar a terapêutica de substituição, ou identificar os portadores em famílias com défices congénitos da coagulação. Os tempos de coagulação são: **Tempo de Protrombina (TP)**, **Tempo de Tromboplastina Parcial (TTP)** e **Tempo de Trombina (TT)**.

O aparelho utilizado para a realização das análises desta secção (coagulação) é o BCS XP. Este é um analisador automático que permite realizar testes de coagulação, de agregação, cromogénicos e imunoquímicos. As análises efectuadas neste são TP, TTP, TT, Antitrombina III, Fibrinogénio, D-Dímeros.

Tempo de Protrombina

O TP é o teste mais frequentemente utilizado e avalia a via extrínseca. Os reagentes usados são a tromboplastina e cálcio ionizado. Estes compostos, quando adicionados ao plasma tratado com citrato, substituem o TF na activação do factor X em presença do factor VII, sem envolver as plaquetas ou os factores da via intrínseca. Quando o TP está aumentado e os outros tempos normais, é indicativo de défice de factor VII. Os valores de TP dependem do tipo de reagente utilizado e do aparelho em questão, estando sujeito a variações significativas entre os laboratórios. Assim sendo, os TPs foram padronizados de acordo com o INR (International Normalized Ratio), que compara o reagente da tromboplastina local contra um reagente internacional. Assim, cada reagente possui um valor relativo (ISI, índice de sensibilidade internacional) ao reagente padrão. Por isso, é necessário corrigir o valor do TP, para ficar normalizado entre laboratórios, independentemente dos reagentes e aparelhos usados, sendo calculado pela fórmula **INR = (TP doente / TP controlo)^{ISI}**. Também é usado para o controlo da terapêutica anticoagulante. (17) (5)

Tempo de Tromboplastina Parcial

Esta análise poderá ter mais designações, tais como Tempo de Tromboplastina Activada, PTT ou Tempo Cefalina Caolino. É um teste usado para avaliar as vias intrínseca e comum da coagulação. O plasma é recalcificado e, depois, é adicionado um reagente contendo factores activadores de superfície, como Caolino, sílica ou ácido elágico, e fosfolípidos. O Caolino acelera a activação por contacto, os fosfolípidos fornecem uma superfície sobre a qual ocorrem as reacções entre enzima e substrato, e o cálcio substitui o cálcio quelado pelo citrato. Permite quantificar a presença dos factores VIII, IX, XI e XII, que devem estar todos presentes em níveis adequados para um TTP normal. Os factores V, X, protrombina e fibrinogénio também devem estar presentes. Este teste também é sensível à presença de anticoagulantes circulantes e heparina. (2) (5)

Tempo de Trombina

O TT determina o tempo necessário para a ocorrência de coágulos numa amostra de sangue obtida com citrato, depois da adição de cálcio e de uma quantidade conhecida de trombina. Avalia a interacção entre a trombina e o fibrinogénio, uma vez que desvia as vias intrínseca e extrínseca, e avalia as etapas finais da via comum. O TT pode estar aumentado nos casos de deficiência ou alterações qualitativas de fibrinogénio, na coagulação intravascular disseminada (CID) ou na presença de anticoagulantes activos na circulação que

interferem na acção da trombina, como é o caso da heparina. As condições que aumentam o TT, o TP e o TTP também estarão aumentados. (2) (5)

Antitrombina III

A antitrombina é um inibidor das serina-proteases que se liga à trombina e aos factores Xa, IXa, XIa e XIIa, neutralizando a sua actividade. A capacidade da antitrombina em neutralizar a actividade da trombina é rapidamente potencializada pela presença de heparina. Deficiências hereditárias de antitrombina tornam os pacientes propensos ao tromboembolismo venoso. (18)

Fibrinogénio

O fibrinogénio é o precursor da fibrina, a qual é formada por clivagem deste precursor pela Trombina. Estes monómeros de fibrina reúnem-se formando a complexa teia de fibrina do coágulo.

O método usado é o de Clauss, no qual o plasma citratado é coagulado com uma quantidade em excesso de trombina. O tempo de coagulação depende da quantidade de fibrinogénio na amostra, sendo inversamente proporcional. (19) (20)

D-Dímeros

Simultaneamente à activação da coagulação ocorre também a activação do sistema fibrinolítico. É um sistema multienzimático que resulta na formação de plasmina. A plasmina remove o coágulo de fibrina através da digestão em pequenos produtos, os produtos de degradação da fibrina (PDF). A produção de plasmina ocorre a partir do plasminogénio e o processo é iniciado pelos activadores do plasminogénio. A estimulação destes activadores pode ocorrer pelo factor XIIa, pela caliceína e por outros activadores do plasminogénio libertados por vários tecidos. O activador de plasminogénio tecidular (t-PA) é o activador mais importante, convertendo o plasminogénio em plasmina no coágulo de fibrina, no local lesionado. O plasminogénio é convertido em plasmina por outros activadores do plasminogénio como uroquinase e estreptoquinase. O plasma contém dois agentes que neutralizam a plasmina: α -1 antiplasmina e α -2 macroglobulina. A clivagem de ligações peptídicas na fibrina e no fibrinogénio produz vários produtos de degradação, os denominados D-Dímeros. (2) (21)

Interpretação de resultados

No caso do Tempo de Protrombina, os resultados têm de ser padronizados e devem ser obtidos através duma curva padrão. Faz-se uma *pool* com vários plasmas normais de indivíduos saudáveis, não medicamentados, jovens e de preferência do sexo masculino, para não haver interferência com terapêutica anticoncepcional, e determina-se o tempo de protrombina desta *pool* que corresponde a 100 % de actividade. A partir desta *pool* fazem-se diluições seriadas em soro fisiológico $\frac{3}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, que correspondem, respectivamente, às %s) de actividade de 75 %, 50 %, 25 %, 12.5 % e determina-se o tempo de protrombina para cada uma. O INR para cada doente determina-se da seguinte forma: **(PT do doente /PT da *pool*)^{ISI}** sendo o ISI um valor dado pelo reagente e podendo ser diferente para cada lote.

Tabela XVI – Considerações a ter no controlo da terapia anticoagulante

Patologia	INR
Trombose venosa profunda, Doenças Arteriais (incluindo Enfarte de Miocárdio)	Embolia 2,0 a 3,0
Válvulas Cardíacas Artificiais, Sistémicas Recidivantes	Embolias 3,0 a 4,5 ou 2,5 a 3,5

(2)

Sempre que os valores de INR estejam de tal forma elevados que possam implicar perigo de hemorragia (INR > 4,5) avisar o utente/clínico.

O resultado é expresso em três unidades: segundos, %, INR.

Dum ponto de vista mais clínico sabe-se que as deficiências dos factores da coagulação podem ser inferidas através da comparação do TP com o TTP. Um TP normal com aumento de TTP aponta para deficiências dos factores VIII, IX, XI e XII e para a doença de von Willebrand, ou seja, anormalidades da via intrínseca. Um TTP normal com um TP aumentado ocorre apenas da deficiência de factor VII. Deficiências congénitas isoladas do factor VII são extremamente raras, mas a combinação de um TTP normal com um TP prolongado ocorre com relativa frequência em pacientes com hepatopatias ou em pacientes submetidos a tratamento com factores anticoagulantes inibidores da vitamina K, como a warfarina. Isto porque o factor VII tem uma semi-vida tão reduzida que é o primeiro factor hepático a entrar em declínio quando há falência da síntese hepática.

Tanto o TP como o TTP estão aumentados na hepatopatia grave ou na terapia estabelecida com warfarina. O tempo prolongado de ambos os testes também ocorre com distúrbios dos factores V, X ou da protrombina, com deficiências adquiridas complexas ou com inibidores. Nos casos de níveis elevados de heparina ou de defeitos congénitos ou

adquiridos do fibrinogénio e com níveis elevados resultantes dos PDF, o TP e o TTP geralmente encontram-se aumentados.

O Fibrinogénio pode, então, encontrar-se em níveis baixos nos casos de Hipofibrinogenémia ou Afibrinogenémia adquiridas ou congénitas. As primeiras podem ser devidas a: coagulação intravascular disseminada, hepatopatias, perda de volume vascular, ou aumento de catabolismo (com choque ou carcinoma). Quanto aos níveis mais altos, podem ocorrer temporariamente, uma vez que o fibrinogénio é uma proteína de fase aguda, ou com o reflexo de hipercoagulabilidade.

Os níveis elevados de D-Dímeros são úteis no diagnóstico de exclusão de Trombose Venosa Profunda e Embolia Pulmonar.

A deficiência de Antitrombina III é observada nas hepatopatias graves, devido à redução da síntese ou consumo elevado.

Tabela XVII – Causas do prolongamento dos tempos Protrombina e Tromboplastina Parcial

Avaliação de TP e TTP prolongados			
Défices	TP prolongado	TTP prolongado	TP e TTP prolongados
Congénito	Défice factor VII	Défice factores VIII, IX, XI, ou XII Doença vW	Défice Protrombina, fibrinogenio, factores V e X Deficiência combinada de factores
Adquirido	Défice Vitamina K Doença hepática Uso warfarina Inibidor Factor VII	Heparina Anticorpo antifosfolípido Inibidores para factores: vW, VIII, IX, XI, ou XII	Doença hepática CID Sobredosagem de heparina ou Warfarina Uso combinado de heparina ou warfarina Inibidor para trombina Inibidor para protrombina, fibrinogénio, ou factores V ou X

(2)

Microbiologia

A Microbiologia nos laboratórios de Análises Clínicas tem um papel muito importante, pois auxilia no diagnóstico e tratamento de infecções.

Métodos de coloração

A coloração com azul-de-metileno é um método de coloração simples que se usa para visualizar mais facilmente o contraste entre bactérias e outro tipo de células. Do mesmo modo, facilita a visualização de gonococos, pois são geralmente intracelulares.

A coloração de Gram permite diferenciar entre as bactérias Gram positivas, que retêm a coloração do complexo corante iodo (violeta escuro), e as Gram negativas, que não resistem à descoloração e necessitam de serem coradas com um corante de contraste para serem visualizadas (coram de vermelho). Bactérias falsamente Gram negativas ocorrem quando a parede celular das Gram-positivas se rompe ou é removida, ou já se encontram mortas.

A coloração de Ziehl-Neelsen é usada para identificar bacilos ácido-álcool resistentes (por exemplo, o bacilo de Koch (BK)), microrganismos estes que são pouco permeáveis a corantes simples. Têm a capacidade de reter o corante e resistir à sua descoloração por álcool e ácidos fortes (enquanto os outros microrganismos descoram). Daí se denominarem por bacilos ácido-álcool resistentes. As outras bactérias são contra-coradas para se visualizarem. (22) (23)

Meios de Cultura

Tabela XVIII – Meios de cultura utilizados na secção de Microbiologia

Meio de Cultura	Constituição	Classificação/Finalidade
Candida (CAN2)	A hidrólise específica de um substrato cromogénio de hexosaminidase leva à coloração azul das colónias de <i>C. albicans</i> . Colónias que coram de rosa são características de <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida lusitanae</i> e <i>Candida kefyr</i> .	Meio cromogénio para o isolamento selectivo das leveduras e a identificação directa de <i>Candida albicans</i> .
Chapman (MSA)	Os microrganismos que fermentam o manitol originam colónias amarelas. O teor elevado em cloreto de sódio do meio limita o desenvolvimento de alguns dos outros germes.	Meio que se destina ao isolamento dos estafilococos, <i>Staphylococcus aureus</i> .

Chocolat + PoliViteX (VCA3)	Este meio é composto por uma base nutritiva enriquecida em factores X (hemina) e V (NAD) fornecidos pela hemoglobina e pelo PolyViteX.	A gelose Chocolate PolyViteX é um meio de isolamento que se destina mais particularmente ao crescimento das estirpes exigentes, como: <i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> .
Chocolat Haemophilus	Base nutritiva rica em factores X e V. A selectividade foi obtida através da associação de antibióticos e antifúngicos.	Meio selectivo para o isolamento das diferentes espécies de <i>Haemophilus</i> em colheitas polimicrobianas de origem humana.
COS	A gelose contém uma mistura de peptonas especialmente adaptada à cultura dos microrganismos exigentes (<i>estreptococos</i> , <i>Listeria</i>).	Meio de isolamento que se destina a facilitar o crescimento de microrganismos exigentes. Detecção das hemólises.
CPS	É constituída por uma base nutritiva rica que associa diferentes peptonas e 2 substratos cromogénicos que permitem revelar a actividade enzimática correspondente. A revelação do indol é favorecida pela incorporação de triptofano na gelose. A concentração elevada em agar evita a invasão de <i>Proteus</i> na gelose.	Meio cromogénico para a contagem dos microrganismos urinários. A contagem microbiana da colheita é feita mediante um método de sementeira padronizada.
Hektoen	Os microrganismos que fermentam um dos três açúcares contidos no meio dão colónias amarelas a amarelas salmão, os outros dão colónias verdes a azuis esverdeadas. Os microrganismos que produzem H ₂ S dão colónias com centro negro. A presença de colónias verdes a azuis-esverdeadas com ou sem centro negro significa grande presunção de <i>Salmonella</i> ou de <i>Shigella</i> . A inibição de microrganismos Gram (+) é obtida por uma mistura de sais biliares e de corantes.	A gelose Hektoen é um meio de isolamento selectivo e de diferenciação que se destina à detecção das <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i> a partir de amostras clínicas (fezes).

Hemoline Perfom Diphase	Frasco Difásico é composto de dois meios de cultura: um caldo enriquecido em factores de crescimento e uma gelose numa das faces do frasco.	Pesquisa dos microrganismos aeróbios responsáveis por septicémias pela cultura de colheitas sanguíneas de origem humana.
Lowenstein-Jensen	Este meio, enriquecido com a presença de ovo, de asparagina e de fécula, favorece o crescimento das micobactérias.	Cultura de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e outras micobactérias.
Gelose Mueller Hinton 2 (MHS)	A composição da gelose é sangue de carneiro permite o crescimento das bactérias tais como os pneumococos e outros estreptococos.	Meio que se destina à realização de antibiogramas por difusão para as estirpes que necessitem de sangue para o seu crescimento.
Gelose Sabouraud Cloranfenicol Actidiona	A presença de peptonas e de glucose favorece o desenvolvimento das estirpes fúngicas. A selectividade do meio em relação à maioria das bactérias é assegurada pelo cloranfenicol. A presença de actidiona inibe algumas espécies de leveduras e fungos filamentosos.	É um meio selectivo para a cultura de algumas espécies de fungos filamentosos (os dermatófitos) a partir de colheitas polimicrobianas.
Sabouraud Gentamicine/ Chloramphenicol	Presença de peptonas e glucose. Presença de gentamicina permite inibir a maioria das bactérias Gram (-) e Gram (+). O cloranfenicol para estirpes resistentes à gentamicina (estreptococos, <i>Proteus</i>). O pH ligeiramente ácido favorece o crescimento dos fungos face ao desenvolvimento bacteriano.	Isolamento selectivo das leveduras e bolores a partir de amostras polimicrobianas.
Gelose SS	Os microrganismos que fermentam a lactose originam colónias rosas, as outras colónias incolores. A presença de colónias incolores representa uma forte possibilidade de <i>Salmonella</i> ou de <i>Shigella</i> .	A gelose SS é um meio de isolamento
Gelose Chromid Strept B (STRB)	Gelose constituída por uma base nutritiva que associa diferentes peptonas, 3 substratos cromogénicos e antibiótico.	Meio cromogénico selectivo utilizado para a detecção de <i>S. agalactiae</i> em mulheres grávidas e em recém-nascidos.

Caldo Todd-Hewitt + Antibióticos	A sua composição favorece o crescimento dos estreptococos no seio de uma flora poli-microbiana. Os antibióticos presentes no meio (ácido nalidíxico e colistina) inibem a maioria dos microrganismos Gram negativos da flora.	Caldo de enriquecimento selectivo destinado à detecção dos estreptococos do grupo B. Este caldo pode também ser utilizado para o enriquecimento de <i>S. aureus</i> , no rastreio de <i>S. aureus</i> resistentes à metilina.
Sabouraud (Meio líquido)	A sua fórmula contém uma base peptonada que favorece o crescimento de leveduras e de bolores.	O meio Sabouraud líquido destina-se à cultura ou à repicagem das leveduras e dos bolores.
Meio Ureia-Indol	A degradação da ureia pelas bactérias que possuem uma urease é seguida de uma alcalinização que provoca a viragem do indicador colorido (vermelho de fenol) a vermelho violeta.	Este meio permite detectar nas enterobactérias a presença de uma urease, de uma triptofano-desaminase (TDA) assim com a produção de indol.
Campyloset Gelose (CAM)	A presença de sangue de carneiro facilita o crescimento da espécie pesquisada. A fertilidade é aumentada devido à utilização de redutores. Os antibióticos e antifúngicos presentes no meio inibem contaminantes.	Isolamento selectivo dos <i>Campylobacter</i> intestinais (<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> principalmente a partir de fezes.
Granada Biphasic broth	Constituído por uma base nutritiva que associa uma peptona, piruvato e glucose. A presença de metotrexato, soro de cavalo e amido permite a produção de um pigmento laranja avermelhado específico das colónias de estreptococos hemolíticos do grupo B.	O caldo Granada bifásico é um meio selectivo utilizado para a detecção e a identificação directa de <i>Streptococcus agalactiae</i> nas mulheres grávidas a partir de colheitas de origem clínica.
Granada Agar	Base nutritiva, metotrexato, soro de cavalo e amido permite a produção de um pigmento cor de laranja a vermelho específico das colónias de estreptococos do grupo B hemolíticos.	Meio selectivo para o rastreio e a identificação dos estreptococos do grupo B (<i>S. agalactiae</i>).
Gelose chromID Salmonella	Base nutritiva associa diferentes peptonas e 3 substratos cromogénicos.	Meio cromogénico para o isolamento selectivo e diferenciação do género <i>Salmonella</i> .

Gelose Sabouraud 2	A presença de peptonas e de glucose favorece o desenvolvimento das estirpes fúngicas. O pH da gelose, ligeiramente ácido, favorece o crescimento de fungos em relação ao desenvolvimento bacteriano.	Cultura de fungos.
---------------------------	--	--------------------

(24)

Sistema Automatizado – Vitek

A identificação de microrganismos e o teste de susceptibilidade de antibióticos são efectuados pelo sistema Vitek 2 Compact da Biomerieux.

Este sistema possui um *software* que estuda e interpreta os dados enviados pelo sistema de leitura do aparelho. Este *software* inclui o chamado AES (Advanced Expert System), o qual cruza a informação da identificação e do antibiograma. Esta informação permite avaliar os valores de Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) e identificar alguns fenótipos de acordo com os resultados obtidos. Esta avaliação final indica se o resultado do antibiograma é consistente com a bactéria identificada.

Cartas de identificação

Cada carta possui poços que contêm substratos bioquímicos desidratados. Não são necessários reagentes adicionais, pelo que se elimina deste modo o risco de omissão ou de erro.

- **GN** – identificação de Gram negativos
- **GP** – identificação de Gram Positivos
- **NHI** – identificação de *Neisserias* e *Haemophilus*
- **YST** – identificação de leveduras

Cartas de antibiograma

A carta teste de Susceptibilidade aos Antibióticos contém poços contendo substratos de antibióticos.

- **AST-N113** – Carta de sensibilidade para Gram Negativos aeróbios (Ambulatório)
- **AST-N151** – Carta de sensibilidade para Gram Negativos aeróbios (Bactérias resistentes)
- **AST-N093** – Carta de sensibilidade para Gram Negativos aeróbios (*Pseudomonas*)
- **AST-P580** – Carta de sensibilidade para *Staphylococcus* spp, (*Enterococcus* spp e *S. agalactiae*)
- **AST-P586** – Carta de sensibilidade para *Enterococcus* spp e *S. agalactiae*

Desta forma, a maioria dos microrganismos são identificados e são realizados os respectivos antibiogramas por este sistema, permitindo uma maior segurança nos resultados obtidos. Uma vez que as cartas são seladas, a possibilidade de contaminação é menor.

Análise microbiológica de produtos biológicos

Urina

Introdução

As infecções do aparelho urinário são uma das infecções mais frequentes no Homem. A infecção urinária aguda é comumente causada por bactérias da flora intestinal saprófita, que invade o aparelho urinário por via ascendente através da uretra. Estas infecções são mais predominantes nas mulheres, pois têm a uretra mais curta.

Os agentes etiológicos mais frequentes nas crianças e adultos, sem outras doenças associadas, são as Enterobactereáceas com grande destaque para a *Escherichia coli*.

Em doentes internados e com factores de risco como algaliação permanente, cálculos urinários e outras patologias do aparelho urinário, o leque de agentes etiológicos alarga-se a outros microrganismos, como *Pseudomonas* spp, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Enterococcus* spp e fungos, estes últimos peculiarmente em doentes que estão sob terapêutica antibiótica. O aparecimento de *Proteus mirabilis* tem peculiar destaque em doentes com cálculos urinários, produzem urease, a qual transforma a ureia em amónia, alcalinizando a urina. Entre as bactérias Gram positivas, o *Staphylococcus saprophyticus* tem uma propensão especial para causar infecções em mulheres jovens sexualmente activas. (25)

Colheita

A urina é habitualmente um líquido biológico estéril, mas a sua passagem através da uretra durante a micção arrasta os microrganismos que a colonizam, podendo induzir erros na interpretação da urocultura.

- Micção “jacto médio“
- Punção de cateter urinário
- Punção supra-púbica
- Drenagem de nefrostomia / ureterostomia
- Saco colector em crianças (26)

Processamento Laboratorial

A urocultura consiste em:

- Exame directo para pesquisa/quantificação dos componentes do sedimento urinário, como células epiteliais de descamação do tracto urinário e hematopoiéticas, bactérias, fungos e cilindros
- Coloração de Gram (cultura positiva ou observação do sedimento anormal)
- Coloração de Ziehl-Neelsen caso a cultura seja negativa com observação do sedimento anormal
- Sementeira em meio de cultura para urinas para quantificação dos microrganismos presentes na amostra

Critérios de interpretação de resultados

As culturas são feitas em Gelose CPS para pesquisa de Gram negativos fermentadores e não fermentadores e Gram positivos. Serve para colocar em evidência o agente bacteriano responsável por uma infecção das vias urinárias. As sementeiras são orientadas pelo observado no exame microscópico directo, coloração de Gram. Além disto, procede-se à identificação presumptiva, através das características macroscópicas das colónias podendo evitar-se o uso a galerias de identificação. Exemplo: *Escherichia coli*, coloração rosa a vermelho escuro das estirpes produtoras de glucuronidase. Posteriormente, procede-se à realização do Antibiograma.

A validação dos resultados deve ter em conta uma série de parâmetros tais como: método de colheita, tipo de doente (exemplos: urológico, geriátrico, gravidez, etc.), sintomatologia, observação microscópica do sedimento urinário e resultado de exames bacteriológicos prévios.

Tabela XIX – Critérios base para validação de uroculturas

Crescimento do nº de colónias	
<10 ²	Negativo
10 ² -10 ³	Contaminação provável não havendo sedimento muito alterado; fazer além do Gram, coloração de Ziehl-Neelsen no caso de sedimento com muitos leucócitos e/ou eritrócitos.
10 ⁴	Contaminação ou início da infecção de um só tipo de colónia. Só fazer antibiograma se o sedimento o justificar.
≥10 ⁵	Infecção urinária de um só tipo de colónia

(26)

Rejeição: Cultura com crescimento $\geq 10^4$ de dois ou mais tipos de colónias diferentes sem sedimento alterado ou com sedimento alterado mas crescimento de mais de dois tipos de colónias.

No caso de utentes grávidas quando detectamos colónias que podem ser de *Streptococcus* β -hemolíticos do grupo B, repicamos para o meio específico, e, dado a importância destas bactérias neste grupo, uma vez que podem provocar ruptura das membranas, parto prematuro, febre na altura do parto, e os recém-nascidos das mães colonizadas, quer no recto quer na vagina, que adquiram estas infecções, podem ter doenças extremamente graves como perda da audição ou da visão, qualquer nº de colónias deve ser reportado para avisar o clínico. (23)

Hemocultura

Introdução

A hemocultura é um meio de diagnóstico de urgência quando se suspeita de um processo de septicémia (febre de ordem indeterminada, estado de choque, infecção localizada profunda).

Numa tentativa de isolar os agentes patogénicos, cultiva-se uma amostra de sangue venoso num meio de enriquecimento para o desenvolvimento de bactérias responsáveis por septicémias, permitindo o crescimento rápido e identificação desses microrganismos. (26)

Colheita

O frasco da hemocultura deve estar à temperatura ambiente antes da inoculação logo deve ser tirado do frio pelo menos 30 minutos antes da colheita. A pele, onde se vai realizar a punção deve ser descontaminada com álcool iodado.

A hemocultura deve ser sempre a 1ª amostra da colheita para haver o menor número de contaminações possíveis, deve ser logo semeada.

Tabela XX – Número e intervalo entre as colheitas de hemoculturas

Sepsis, meningite, pneumonia	Colher sequencialmente em locais diferentes 2 a 3 hemoculturas
Febre de origem desconhecida	Colher inicialmente 2 a 3 hemoculturas. Se negativas entre as 24h e as 36, efectuar mais hemoculturas.
Endocardite infecciosa	Efectuar 3 hemoculturas no 1º dia. Se negativas às 24h, repetir colheita de 3 hemoculturas.
Doentes com terapêutica antimicrobiana	A colheita deve ser feita imediatamente antes da toma do antibiótico

O número e intervalo entre as colheitas de hemoculturas dependem da situação clínica e da urgência que existe para iniciar antibioticoterapia. Efectuam-se colheitas de 10 a 30 ml num adulto ou 1 a 5 ml numa criança, de sangue venoso colhido assepticamente, de preferência antes do episódio febril, porque no pico febril há lise bacteriana e a quantidade de bactérias diminui. Nunca refrigerar as hemoculturas após a colheita. (26)

Processamento Laboratorial

O meio utilizado é Hemoline performance diphasique. Todos os dias é observada a turvação, a hemólise, a formação de película ou colónias visíveis na transição entre o sedimento eritrocitário e o meio de cultura ou a presença de colónias no meio gelosado.

Caso a amostra seja suspeita faz-se uma Coloração de Gram, sementeira em meio de gelose de sangue ou outros sugeridos pelo Gram. Passadas o tempo de incubação, fazer a leitura da placa após o tempo de incubação, observando o crescimento das colónias.

No caso de haver suspeita de Brucelose, prolongar a incubação até 28 dias. Toda a manipulação para a *Brucella* spp tem que ser obrigatoriamente feita em câmara de fluxo laminar. (26)

Critérios de interpretação de resultados

Devido às rigorosas condições de assepsia durante a colheita e manipulação alguns resultados poderão não ser valorizados, tais como:

- Crescimento na gelose de sangue de mais de dois tipos de colónias (possível contaminação de colheita).
- Crescimento de flora saprófita da pele.
- Crescimento de um potencial contaminante numa só hemocultura sugere contaminação.

No entanto, *Staphylococcus* coagulase negativa podem estar associados a contaminações. Mas, nos pacientes hemodialisados, ter em atenção que podem ser o agente causal. Nesse caso, convém fazer um exame bacteriológico do cateter. Além disso, confrontar o resultado das diversas hemoculturas. (26)

Aparelho Respiratório Superior

Introdução

As infecções do aparelho respiratório superior são muito frequentes, sendo a maioria de causa viral. O diagnóstico bacteriológico dessas situações representa uma tentativa de identificar, entre uma flora comensal abundante, o(s) agente(s) provocante(es) da infecção.

Existem vários agentes potencialmente patogénicos, tais como o *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, leveduras e membros das *Enterobacteriaceae*, podem constituir uma flora transitória ou estar presente em número reduzido na orofaringe de indivíduos saudáveis.

Nos seios paranasais e ouvido médio não há flora microbiana em indivíduos saudáveis. (26)

Colheita

Exsudados orofaríngeo e amigdalino e/ ou exsudado nasal em zaragatoas com meio de transporte.

Processamento Laboratorial

Tabela XXI – Meios a usar nos exsudados nasal, orofaríngeo e amigdalino

Exsudado nasal	Exsudado orofaríngeo e amigdalino
Coloração de Gram para avaliação do conteúdo em espécies Gram positivas e negativas	
Amostra é semeada em meio de gelose sangue (pesquisa de <i>Streptococcus</i>)	
Meio Chapman (pesquisa de <i>Staphylococcus</i>)	
Meio Albicans (pesquisa de leveduras)	

Existem um conjunto de procedimentos específicos do exsudado oro-faríngeo e amigdalino. Observação de associação “fuso-espiralar”. Quando é pedida apenas a pesquisa de *Streptococcus A*, só se semeia a amostra em meio de gelose sangue e caldo Todd-Hewitt. Se for pedido pesquisa de *Borrelia vincentii* e *Fusobacterium spp* usar uma coloração específica com fuscina de Ziehl diluída (1:10). Na faringite gonocócica ou *Neisseria meningitidis* semear o chocolate Thayer-Martin e a colheita é feita com zaragatoa de carvão. (26)

Critérios de interpretação de resultados

Nos resultados constam a observação do Gram, o exame micológico, em que se identificará a levedura nos casos positivos. A nível bacteriano o resultado é confrontado com alguns conhecimentos teóricos que revelam a importância do encontrado.

Assim, sabe-se que para a faringite bacteriana a principal causa é o *Streptococcus* β -hemolítico do grupo A de Lancefield. Outras causas de faringite são a *Neisseria gonorrhoeae*, *Bordetella pertussis* e *Corynebacterium diphtheriae*, devendo a pesquisa destes agentes ser efectuada unicamente quando existe suspeita clínica e por solicitação específica do clínico.

O isolamento de *Staphylococcus aureus* e *Neisseria spp*, em portadores são reveste-se de importância epidemiológica. No entanto, a *Neisseria gonorrhoeae* pode causar faringites exsudativas, sobretudo em indivíduos que praticam sexo oro-genital.

O *H. influenzae* é frequentemente isolado em amostras naso e orofaríngeas, mas não é vulgarmente causador de faringite. Porém, a epiglotite é uma infecção grave causada por este microrganismo. Nesta patologia, a amostra recomendada para diagnóstico é, no entanto, a hemocultura. (26)

Aparelho Respiratório Inferior

Introdução

Nas vias aéreas inferiores, as infecções pulmonares crónicas podem resultar de imensas bactérias no parênquima pulmonar. Manifestam-se por sinais pulmonares discretos e variáveis conforme o agente infeccioso.

Uma das infecções prioritária em saúde pública continua a ser a tuberculose. O agente causal é *Mycobacterium tuberculosis*. Esta tem como característica ser difícil de corar, mas uma vez corada resiste à sua descoloração com álcool-ácido. Assim, denomina-se por bacilo álcool-ácido resistente. (23)

Nas infecções vulgares, as bactérias mais frequentes ocorrem em doentes com 50 a 60 anos e com doenças crónicas concomitantes, tais como a bronquite crónica, DPOC, diabetes ou alcoolismo. Os agentes mais usuais são *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* (em doentes idosos), *Moraxella catharralis*, Bacilos Gram Negativos, *Legionella pneumophila*.

Além disso, não podemos esquecer que expectoração virá contaminada com a flora normal do tracto respiratório superior e da boca.

Tabela XXII – Flora normal do tracto respiratório superior e boca

Tracto respiratório superior	Língua e mucosa bucal
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus</i> spp
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Neisseria</i> spp
<i>Neisseria</i> spp	<i>Lactobacillus</i> spp
<i>Haemophilus</i> spp	Leveduras (<i>Candida</i> spp)

Colheita

Expectoração, colhida para um recipiente estéril, de preferência ao levantar de manhã, após lavagem da boca e gargarejos com água recentemente fervida e arrefecida. Colheita da expectoração após tosse profunda.

Processamento Laboratorial

O estudo da expectoração consiste em:

- Coloração de Gram para avaliação do conteúdo em espécies Gram positivas e negativas
- Coloração de Ziehl-Neelsen para pesquisa de bacilos ácido-álcool resistentes.
- Sementeira para pesquisa de microrganismos.

A amostra é semeada em meio de gelose sangue (pesquisa de *Streptococcus*), meio Sabouraud com e sem cromogéneos (pesquisa de leveduras), meio de gelose chocolate

(pesquisa de *Haemophilus*), meio Manitol (pesquisa de *Staphylococcus*) e meio de gelose para bacilos Gram negativos (pesquisa de enterobactérias).

Para pesquisa cultural de micobactérias, a amostra sofre primeiramente um processo de digestão e descontaminação, após o qual é cultivada em meio de Lowenstein. Findo o tempo em cultura, confirma-se a presença de bacilos álcool-ácido resistentes por coloração de lâmina pelo método de Ziehl-Neelsen e identifica-se a espécie.

Critérios de interpretação de resultados

Tabela XXIII – Classificação das amostras segundo a tabela de Murray e Washington

	Células epiteliais / Pequena ampliação (10 X)	Leucócitos / Pequena ampliação (10 X)
Grupo I	25	10
Grupo II	25	10-25
Grupo III	25	25
Grupo IV	10-25	25
Grupo V	<10	25

O laboratório deve processar apenas as amostras de boa qualidade que segundo este critério, processar as amostras que se englobem nos grupos IV e V.

Não deverá ser aplicado este critério em doentes neutropénicos e na pesquisa de agentes específicos, tais como *Mycobacterium* spp, *Legionella* spp, *Mycoplasma* spp. Estes agentes patogénicos não fazem parte da flora normal do aparelho superior.

Para além disto há uma difícil avaliação que tem de ser feita. Sabe-se que na presença de um exame cultural positivo, mas com número de leucócitos baixo, Ziehl negativo e flora bacteriana polimórfica, este não tem significado clínico. No entanto, se a flora for monomórfica deve valorizar-se e identificar o microrganismo. No caso de número elevado de leucócitos também consideramos os microrganismos mais relevantes. (26)

Exsudado ocular

Introdução

As infecções oculares abrangem infecções das estruturas externas do olho (blefarites, conjuntivites e queratites), das estruturas internas do olho (endofalmites) e infecções do sistema lacrimal (canaliculites, dacriocistites, dacrioadenites).

Tabela XXIV – Infecções oculares

Blefarite	Infecção aguda ou crónica da margem da pálpebra envolvendo a pele e pestanas
Conjuntivite	O tipo mais frequente de infecção ocular e pode ocorrer por inoculação directa ou exógena, ou por disseminação hematogénica
Queratite	Infecção da córnea
Endoftalmite	Infecção da cavidade ocular e tecido intraocular, a mais grave do olho
Canaliculite	Inflamação do canal lacrimal
Dacriocistite	Infecção do saco lacrimal
Dacrioadenite	Infecção das glândulas lacrimais

Ao nível do saco conjuntival existe uma flora saprófita constituída sobretudo por *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium* spp, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*.

Com menor frequência podem ser encontrados *Haemophilus influenzae*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* spp, *Moraxella catarrhalis* e fungos.

Colheita

- Dacrioadenite, dacriocistite e blefarite: exsudado ocular colhido pelo técnico de colheitas.
- Colheitas da conjuntiva, queratite e endoftalmite serão feitas pelo clínico.

Processamento Laboratorial

O estudo do exsudado ocular baseia-se em coloração de Gram para avaliação do conteúdo em espécies Gram positivas e negativas e sementeiras para pesquisa de microrganismos.

A amostra é semeada em meio de gelose de sangue (pesquisa de *Streptococcus*), meio Albicans (pesquisa de leveduras), meio Chapman (pesquisa de *Staphylococcus*), gelose para bacilos Gram negativos (pesquisa de enterobactérias) e meio de chocolate de *Haemophilus* (pesquisa de *Haemophilus*).

No caso de se tratar de um recém-nascido, deve-se fazer o despiste da oftalmia gonocócica semeando a amostra também em meio de gelose de chocolate (pesquisa de gonococo).

Após a sementeira a leitura das culturas deve ter em conta a quantidade de microrganismo recuperado mesmo que este faça parte da flora saprófita como é o caso do *Staphylococcus aureus*.

Critérios de interpretação de resultados

Na avaliação dos resultados à que ter em conta os principais agentes causadores de infecção:

Tabela XXV – Microrganismos causadores das infecções oculares

Dacrioadenite	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> ,
Dacriocistite	<i>Haemophilus influenzae</i>
Caniculite	<i>Propionibacterium propionicus</i> , <i>Streptococcus viridans</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Actinomyces israelii</i> e Difteróides
Queratite Endoftalmite	Situação urgente (pode perder o olho em 24 h): <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ou <i>Staphylococcus aureus</i> , podendo haver outros agentes de infecção: <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> e <i>Acanthamoeba</i> spp

(26) (23)

Exsudado auricular

Introdução

As infecções auriculares podem surgir no ouvido externo (otite externa) e no ouvido médio (otite média).

A otite média é uma infecção muito frequente em bebês e crianças. Os agentes mais frequentes são *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*. Podem ocorrer infecções menos frequentes por *S. aureus*, *M. catarrhalis*, *Enterobacteriaceae* e anaeróbios.

A otite externa é análoga às infecções da pele e tecidos moles. A causa mais comum desta infecção é a *Pseudomonas aeruginosa*. Os microrganismos que normalmente se encontram neste produto biológico (flora normal) incluem *Staphylococcus epidermis* e *Corynebacterium* spp. (26)

Colheita

Amostra de exsudado auricular colhido do canal auricular externo é efectuada pelos técnicos de colheitas. As amostras das zonas dos ouvidos internos e médios são colhidas apenas pelo clínico.

Processamento Laboratorial

O estudo do exsudado auricular consiste em coloração de Gram e sementeiras em gelose sangue (pesquisa de *Streptococcus*), em Sabouraud com e sem cromogéneos (pesquisa de leveduras), em gelose chocolate (pesquisa de *Haemophilus*), em manitol (pesquisa de *Staphylococcus*) e em gelose para bacilos Gram negativos (pesquisa de enterobactérias). Identificação da bactéria patogénica e antibiograma.

Aparelho Gastrointestinal

Introdução

As infecções do aparelho gastrointestinal têm elevada incidência na população em geral, com grande morbidade em alguns grupos de etários, como é o caso das crianças e

idosos. Os antecedentes epidemiológicos, a existência de factores predisponentes, a presença de sinais e sintomas clínicos e o tipo de diarreia devem orientar na pesquisa do agente etiológico.

As enterocolites agudas são infecções do intestino delgado ou do cólon devidas a bactérias entero-invasivas, bactérias toxinogénicas não invasivas e a exotoxinas bacterianas produzidas nos alimentos.

As bactérias com características invasivas, capazes de destruir a mucosa, aderem às células epiteliais, penetram e multiplicam-se, originando o síndrome desintérico (*Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*). As bactérias produtoras de exotoxinas ou enterotoxinas fixam-se à superfície da mucosa, mas não penetram no epitélio e produzem uma exotoxina (*Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Bacillus cereus* produtor de enterotoxina termolábil, *Campylobacter jejuni*). (22) (27) (28)

Nas enterocolites necrosantes, a necrose é provocada por uma isquemia intestinal que favorece a proliferação bacteriana: enterocolites do recém-nascido por *Escherichia coli* enteropatogénica, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium butyricum*, e enterocolites do adulto por *Clostridium perfringens*. (26)

Além disto, também poderá ser feita a pesquisa de parasitas e fungos nas fezes.

Colheita

Devem ser obtidas até um total de três amostras de fezes cerca de 1 a 2 gramas.

Processamento Laboratorial

Tabela XXVI – Processamento laboratorial de fezes

Coloração de Gram	Avaliação de Gram e presença de leveduras
Meio selectivo Hektoen ou SS, meio cromogénico (opcional)	Pesquisa de <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i>
Meio Tetrationsato	Meio de enriquecimento
Campyloset	<i>Campylobacter</i>
Meio Sabouraud com cromogénicos	Pesquisa de leveduras
Manitol	<i>Staphylococcus aureus</i>

Observação de duas lâminas, uma com montagem directa em solução salina, e outra onde se analisa o sedimento proveniente do método de concentração de parasitas. Os parasitas microscópicos podem concentrar-se e separar-se de outros elementos das fezes por um método bifásico. Os ovos, as larvas e os quistos dos parasitas são concentrados num sedimento, após tratamento das fezes com solução tampão de ácido acético e com éter. (28)

Não é aplicável à pesquisa de *Cryptosporidium* e Microsporidia pois requerem o uso de técnicas de coloração apropriadas.

Critérios de interpretação de resultados

Após a observação dos meios de cultura, fazer a identificação e TSA de colónias suspeitas de causar infecção. No caso de *E. coli* enteropatogénica dar positivo, não fazer antibiograma pois a lise das bactérias com o antibiótico faz libertar a toxina o que é ainda mais grave. A alta prevalência de certos patogénicos é um grave problema de Saúde Pública. (28)

Para uma correcta identificação dos parasitas confronta-se o obtido com imagens de referência.

Aparelho Genital

Introdução

A determinação de amostras apropriadas para o diagnóstico de infecções do aparelho genital depende do local de infecção e dos microrganismos. Algumas infecções do aparelho genital feminino são devidas a microrganismos endógenos cuja patogenicidade é activada por factores do hospedeiro ou por desequilíbrio da flora saprófita.

A flora vaginal é constituída por diversas espécies, predominantemente *Lactobacillus* ou bacilos de Döderlein (Gram variáveis, finos e compridos). Na infância e após a menopausa, dada a ausência de estrogénios, o pH vaginal torna-se neutro e a flora vaginal é substituída por outras espécies microbianas.

Nas cervicites, infecções do epitélio do endocolo marcadas por uma leucorreia purulenta, os principais microrganismos associados são *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*.

As uretrites são infecções da uretra com sintomatologia mais marcada no homem que na mulher, a qual podem apresentar infecções assintomáticas (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*). As vaginites e bartolinites, infecções do epitélio vaginal e das glândulas de Bartholin, estão associadas à flora comensal (*Gardnerella vaginalis*).

Habitualmente pesquisa-se a presença de fungos (nomeadamente *Candida* spp), parasitas (*Trichomonas vaginalis*) e bactérias (*Gardnerella vaginalis*). A possível pesquisa de outros agentes, nomeadamente *Streptococcus* β-hemolíticos do grupo B de Lancefield (*Streptococcus agalactiae*), *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*, só serão efectuadas mediante prescrição orientada. A presença de substratos específicos (ureia para *U. urealyticum* e arginina para *M. hominis*) e de um indicador

(vermelho de fenol) permite, em caso de cultura positiva, visualizar uma mudança de cor do caldo associada a um aumento de pH. (26)

Em grávidas, fazer sempre sementeira em gelose de sangue para pesquisa de *Streptococcus agalactiae*. Em crianças, mulheres no pós-parto e sempre que seja prescrito pelo clínico fazer sementeira em gelose de sangue para pesquisa de *Streptococcus* grupo A.

Colheita

Exsudado uretral, vaginal e/ou rectal. Espermocultura. Pesquisa de *Chlamydia trachomatis* e Micoplasmas genitais deve ser feita raspagem celular com zaragatoa de alginato de cálcio, após remover o excesso de muco.

Processamento Laboratorial

Tabela XXVII – Exame microscópico

	Pesquisa de <i>Trichomonas</i>	Coloração de Gram	Coloração azul de metileno	Pesquisa de “clue cells”	Leucócitos, eritrócitos, bactérias
Exsudado uretral	X	X	X		
Exsudado vaginal	X	X	X	X	
Exsudado rectal	X	X	X		
Espermocultura	X	X	X		X

A Coloração com azul de metileno melhora a visualização do gonococo. No exsudado vaginal verifica-se o pH do muco.

Tabela XXVIII – Exame cultural

	Gelose de sangue	Sabouraud	Gelose de chocolate	Manitol	Gelose bacilos Gram negativos
Exsudado uretral	X	X	X	X	X
Exsudado vaginal	X	X	X		
Exsudado rectal	X	X	X	X	
Espermocultura	X	X	X	X	X

No exsudado vaginal das grávidas semear também meio de enriquecimento caldo Todd-Hewitt e no dia seguinte passar para meio cromogénico para *Streptococcus agalactiae*. Poderá também semear-se em meio para pesquisa de *Gardnerella vaginalis* (exame directo seja suspeito).

Critérios de interpretação de resultados

Após a observação dos meios de cultura, fazer a identificação e TSA de colónias suspeitas de causar infecção.

Alguns agentes de infecção são reportados sem antibiograma, uma vez que são sensíveis às moléculas utilizadas para o seu tratamento (*Gardnerella vaginalis*). A *Neisseria*

gonorrhoeae deve sempre ser reportada com antibiograma pois o seu nível de resistência às penicilinas tem aumentado notavelmente. Estas resistências são ainda mais prevalentes nos homossexuais. (30)

Exsudados purulentos

Introdução

Muitas são as situações clínicas e muitos são os respectivos microrganismos responsáveis por infecções localizadas que acarretam à formação destes exsudados.

Perante a diversidade de situações clínicas e de agentes microbianos implicados, os procedimentos a seguir descritos aplicam-se à maioria das situações, no entanto, não se pode excluir a necessidade de métodos específicos quando a situação nosológica indique a probabilidade de se tratar de um agente particular, por exemplo pesquisa de bactérias anaeróbias.

Colheita

Amostras de exsudado de feridas colhidas com uma zaragatoa em meio de transporte apropriado, e/ou raspados colhidos assepticamente. Semear logo que possível. Não usar zaragatoas secas.

Processamento Laboratorial

É efectuada coloração de Gram para avaliação do conteúdo em espécies Gram positivas e negativas e sementeiras para pesquisa de microrganismos. A amostra é semeada em meio de gelose de sangue (pesquisa de *Streptococcus*), meio Albicans (pesquisa de leveduras), meio Chapman (pesquisa de *Staphylococcus*) e meio de gelose para bacilos Gram negativos (pesquisa de enterobactérias).

Critérios de interpretação de resultados

Distinguir na valorização das culturas microrganismos da pele ou contaminantes dos potenciais agentes patogénicos. Microrganismos mais habituais encontrados na pele *Candida* spp, *Micrococcus* spp, *Staphylococcus* spp, *Clostridium* spp, *Lactobacillus* e *Diphtheroids*. (26)

Dermatomicoses

Introdução

Os fungos patogénicos mais comuns em doenças infecciosas da pele, cabelo e unhas são os Dermatófitos. Estes fungos possuem predilecção por locais quentes e húmidos (virilha, axilas, região interdigital) e vulgarmente as micoses causadas por estes fungos são auto-limitadas.

Colheita

Amostra do tecido queratinoso (unha, cabelo, barba, bigode, pele) e raspagem da zona envolvente. Colher assepticamente para um recipiente estéril (exemplo: caixa de Petri). Não colocar a amostra num recipiente rolhado, sem respiração, pois mantém a amostra húmida permitindo o crescimento de bactérias e de fungos saprófitas.

Processamento Laboratorial

A pesquisa micológica subcutânea engloba dois tipos de exames: exame directo e exame cultural. Para o exame directo, observam-se ao microscópico preparações do tecido queratinoso parcialmente digerido e tornado transparente com uma solução de hidróxido de potássio. A outra parte da amostra é usada para a sementeira em meio Sabouraud com os antibióticos gentamicina e cloranfenicol para inibirem o crescimento de bactérias.

Critérios de interpretação de resultados

Aceitam-se os resultados em que há observação de células do tecido queratinoso no exame directo, com ou sem crescimento no meio de cultura, deve menosprezar-se os fungos ambientais. (22)

Identificação de bactérias

Cocos Gram Positivos

Os Cocos Gram positivos aeróbios dividem-se na família *Micrococcaceae* em dois grandes grupos: Catalase positiva, em que se destacam os *Staphylococcus* e os *Micrococcus*. E catalase negativa, entre os quais temos os *Streptococcus* e os *Enterococcus*.

Para identificação destas bactérias é essencial a observação da sua morfologia ao microscópio após coloração pela técnica de Gram, o aspecto macroscópico das colónias em meios de cultura sólidos (selectivos ou não selectivos) que pode sugerir a possível identificação e as provas específicas de identificação.

- ***Staphylococcus***: cocos em cachos: isolados, aos pares, em tétradas
- ***Streptococcus***: cocos em cadeias de comprimento variável
- ***Streptococcus pneumoniae***: diplococos Gram positivos ovóides ou lanceolados, com as extremidades mais largas opostas, por vezes capsulados

No meio Chapman colónias isoladas com viragem do meio para vermelho deve-se ao crescimento selectivo de *Staphylococcus* spp (normalmente coagulase negativos). Quando relevante clinicamente identificar e fazer o antibiograma (ATB) no sistema Vitek. As colónias isoladas com halo amarelo, o que indica a produção de ácido a partir do manitol são suspeitas de *Staphylococcus aureus*. Confirma-se com a prova da coagulase ou com o teste rápido Slidex Staph Plus. Os *Staphylococcus aureus* são coagulase positiva. Procede-se à sua

identificação e respectivo ATB, bem como para os *Staphylococcus* coagulase negativa. Os *Staphylococcus* coagulase negativa, se bem que sejam considerados saprófitas ou de baixa patogenicidade para o homem, são cada vez mais valorizados como agentes oportunistas de infecção. Sempre que isolados de locais habitualmente estéreis. Para as colónias suspeitas da Gelose de Sangue e Gelose de Chocolate faz-se o mesmo. No entanto, nestes dois últimos meios terá de se fazer a prova da Catalase. Caso seja negativa suspeita-se de bactérias do género *Streptococcus*. Verifica-se a hemólise da colónia. Se tiver α -hemólise faz-se um exame corado de Gram (diplococos – *Streptococcus pneumoniae*. De seguida, faz-se Slidex penumo-kit. Para a β -hemólise procede-se à realização do Slidex strepto-kit. Se for positivo temos um *Streptococcus pyogenes* do grupo A ou *Streptococcus agalactiae* do grupo B. O ATB é realizado com galeria ATB Strep. Em geral, o *Streptococcus pneumoniae* valoriza-se nas expectorações. E o *Streptococcus agalactiae* nos exsudados uretral e vaginal. O *Streptococcus pyogenes* nos exsudados nasal e faríngeo e na expectoração. Se negativo nestas provas e se for relevante prossegue-se com a identificação no sistema Vitek e respectivo ATB. (22) (23)

Bacilos Gram negativos – *Enterobacteriaceae*

As bactérias da família das ***Enterobacteriaceae*** são agentes usuais de infecção no Homem. Estas estirpes bacterianas são das mais frequentemente isoladas no Laboratório de Microbiologia, do ambiente ou colonizadores de outros animais. As *Enterobacteriaceae* são oxidase negativa, fermentam a glicose e a maior parte também reduz os nitratos a nitritos, frequentemente agentes de infecção nosocomial, podem provocar infecções endógenas.

Tabela XXIX – Relevância clínica das bactérias da família das *Enterobacteriaceae*

Bactérias patogénicas oportunistas	Bactérias patogénicas obrigatórias
<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp
<i>Klebsiella</i> spp	<i>Shigella</i> spp
<i>Proteus</i> spp	<i>Yersinia pestis</i>
<i>Enterobacter</i> spp	<i>Y. enterocolítica</i>
<i>Serratia</i> spp	<i>Y. pseudotuberculosis</i>

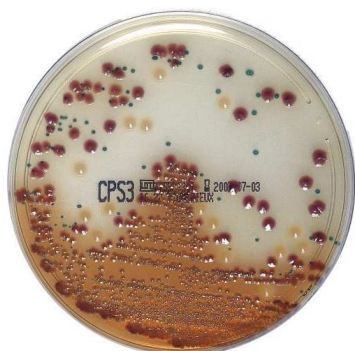


Figura nº6 – Colónias de *E.coli*, *Proteus* e *Enterococcus*

A identificação deste tipo de bactérias é muito comum nas uroculturas pelo meio CPS. Este meio cromogénico origina colónias características:

- Colónias arroxeadas e teste do Indol positivo – *Escherichia coli*
- Colónias azuis-esverdeadas, pequenas e secas e cocos Gram positivos – *Enterococcus* spp)
- Colónias verdes, grandes e mucoides – Grupo KES, suspeita de *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia*
- Colónias incolores a castanho e Indol positivo suspeitas de *Proteus*, *Providencia* ou *Morganella*. TDA positivo – *Proteus mirabili*

Nas situações em que é efectuada a identificação, pelas características acima nomeadas, apenas é necessário realizar o ATB. Se tal não acontecer procede-se à identificação e ATB.

Nas coproculturas com colónias suspeitas de *Salmonella* ou de *Shigella* aparecem colónias transparentes no meio SS e verdes no Hektoen. São efectuados os respectivos testes serológicos.

Nas geloses de sangue ou geloses de chocolate sem inibidores de crescimento, quando se observam bacilos Gram negativos faz-se a prova da oxidase. Quando a prova é negativa suspeita-se de enterobactérias pelo contrário se a prova for positiva suspeita-se de bacilos não fermentadores. (22) (23)

Bacilos Gram negativos não fermentativos

Grupo de bactérias aeróbias estritas não esporuladas que se desenvolvem rapidamente nos meios rotineiros de cultura e se caracterizam por não produzirem energia pelo processo da fermentação, ou seja, na fosforilação oxidativa, o aceitador final dos electrões é simplesmente o oxigénio. Nos laboratórios de Microbiologia a maioria das colónias são das espécies *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*.

Pseudomonas aeruginosa tem como principais características:

- Aeróbios estritos
- Oxidase positiva
- Bom crescimento a 42°C
- Infecções oportunistas
- Produção de pigmento azul-esverdeado (piocianina), ou vermelho acastanhado (piorubina) (22) (23)

Cocobacilos Gram Negativos

Género *Haemophilus*

As espécies deste género fazem parte da flora habitual do aparelho respiratório superior humano (com excepção do *H. ducrey*). As espécies consideradas patogénicas para o homem são: *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *H. aphrophilus* e *H. ducrey*. O *H. ducrey* é agente patogénico obrigatório exclusivamente humano (doença sexualmente transmissível). As espécies desenvolvem-se em aerobiose, mas o seu crescimento é estimulado com atmosfera suplementada com 5% de CO₂ são identificadas pelo seu comportamento frente a dois factores de crescimento: factor X (hemina) e factor V (NAD – nicotinamida adenina dinucleótido).

Tabela XXX – Exigência de factores de crescimento de bactérias do género *Haemophilus*

<i>Haemophilus influenzae</i>	factor x + v
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	factor v
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	factor x
<i>Haemophilus ducrey</i>	factor x

Assim estas bactérias crescem em gelose chocolate e gelose com sangue com o factor exigido pela bactéria em causa. Posteriormente, identificação suspeitas das colónias através do Vitek e antibiograma ATB HAEMO. (22) (23)

Género *Neisseria*

Estes microrganismos são:

- Cocos Gram negativos
- Organizam-se em pares ou pequenas cadeias com forma riniforme
- São imóveis e não produzem esporos
- Crescimento óptimo a 35° C
- São capnofílicas e desenvolvem-se melhor em atmosfera húmida
- Todas as espécies são oxidase positiva e catalase positiva (excepto a *N. elongata* que catalase negativa)

Neisseria gonorrhoeae e *Neisseria meningitidis* encontram-se em amostras respiratórias e urogenitais. (22) (23)

Antibiograma ou TSA

Este estudo é importante para determinar o comportamento de uma estirpe perante os antibióticos, ou seja, saber da sua sensibilidade ou resistência. Pode ser feito pelos métodos de Difusão e Automatizados. O TSA deve ser efectuado nas seguintes situações:

- Para qualquer microrganismo que seja responsável por um processo infeccioso e que exija de terapêutica antimicrobiana
- Estudos epidemiológicos de resistência e em estudos de novos agentes antimicrobianos
- Em todos os microrganismos isolados de locais ordinariamente estéreis (sangue, por exemplo)
- Nas situações clínicas que requerem terapêuticas prolongadas
- Na ausência de resposta à terapêutica empírica instituída

A tecnologia veio ajudar a resolver de forma satisfatória as necessidades actuais, isto é, tornou possível a automatização do antibiograma. Estes métodos podem ser quantitativos, ou seja, determinam as concentrações mínimas inibitórias (MICs) ou qualitativos, com a determinação dos *Break Point* e a classificação em Sensível, Resistente ou Intermédio, úteis para a maioria das situações do dia-a-dia pelo Sistema VITEK.

A prova de susceptibilidade antimicrobiano manual é a técnica de Kirby-Bauer ou teste de difusão do disco. Uma placa de meio Muller-Hinton, previamente inoculada com uma suspensão do microrganismo em estudo, é incubada juntamente com vários discos impregnados com diferentes antibióticos em concentrações específicas. A resistência ou susceptibilidade da bactéria ao antibiótico é determinada pela aparição da zona ou halo de inibição do crescimento à volta do respectivo disco. (31)

Tabela XXXI – Antimicrobianos

Culturas de amostras que não urina	Ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico trimetoprim + sulfametoxazol (cotrimoxazol), eritromicina, benzilpenicilina, tetraciclina e gentamicina (ou cefaloridina ou estreptomina)
Culturas isoladas da urina	Ampicilina, trimetoprim + sulfametoxazol (cotrimoxazol), norfloxacin, nitrofurantoína, cefaloridina ou tetraciclina
<i>Staphylococcus spp</i>	Oxacilina (disco de 1 ug) ácido fusídico, penicilina (benzil), tetraciclina, clindamicina, trimetoprim +sulfametoxazol (cotrimoxazol) ou gentamicina
Outros cocos e bactérias Gram-positivas	Ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefaloridina, cotrimoxazol, eritromicina, penicilina (benzil) e tetraciclina

Maior parte dos bacilos Gram-negativos	Ampicilina, amoxicilina/ ácido clavulânico, cefaloridina, trimetoprim + sulfametoxazol (cotrimoxazol)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	É normalmente resistente a vários antibióticos, incluindo penicilina, ampicilina, várias cefalosporinas e cloranfenicol. É normalmente sensível a aminoglicosídeos, penicilinas semi-sintéticas tal como apiperacilina, e azlocilina, cefalosporinas de 3. ^a geração, ceftazidima e imipenem. A maior parte das vezes, o tratamento de infecções severas com <i>P. aeruginosa</i> requer uma terapia com uso de duas drogas, como por exemplo, ceftazidima com tobramicina ou piperacilina com tobramicina
<i>Streptococcus spp</i> <i>S. pneumoniae</i>	Ampicilina, amoxicilina/ ácido clavulânico, penicilina G, cefotaxima ou ceftriaxona, eritromicina, aminoglicosídeo e vancomicina. Não usar trimetoprim + sulfametoxazol (cotrimoxazol) em meios com sangue
<i>Salmonella e Shigella</i>	Uma ampicilina, uma quinolona e cotrimoxazol

Alguns dos antimicrobianos que deverão ser utilizadas para a técnica de Kirby-Bauer de acordo com as recomendações NCCLS, EUCAST e CLSI. Há que ter em conta que o tamanho do halo é inversamente proporcional à CIM do microrganismo e é obtido um resultado qualitativo que se exprime em sensível, intermédio ou resistente. (26)

Tabela XXXII – Antibióticos na gravidez

Antibiótico	1º Trimestre	2º Trimestre	3º Trimestre
Penicilinas	Sim	Sim	Sim
Cefalosporinas	Sim	Sim	Sim
Macrólidos	Sim	Sim	Sim
Aminoglicosídeos	Não	Não	Não
Sulfonamidas/Trimetroprim	Não	Não	Não
Quinolonas	Não	Não	Não
Nitrofuranos	Não	Sim	Não

Existem vários antibióticos que são prejudiciais à grávida e como tal não deverão ser administrados durante a gravidez.

Conclusão

A realização deste relatório de estágio teve um aspecto muito positivo, ao nível da consolidação de conhecimentos. Contudo, haveria muito mais para evidenciar.

Além disso, permitiu um conhecimento mais acentuado da realidade vivida nos dias de hoje nos laboratórios de Análises Clínicas.

A automatização é uma clara evidência nos laboratórios e imposta pelo incremento do número de parâmetros e do número de amostras a analisar. Esta situação é ainda mais evidente, quando ocorrem fusões e aquisições de laboratórios.

O laboratório onde realizei o estágio é dotado dos equipamentos mais sofisticados do mercado, ou seja, possui tecnologia de ponta.

A tecnologia e a automatização permitiram, claramente, uma maior eficiência, uma maior produtividade, uma menor variabilidade humana, uma menor exposição a fluídos biológicos associada a um menor risco de contaminação e também uma maior rentabilização destes laboratórios, pois verifica-se uma redução dos custos, através da redução dos custos com salários que têm um peso significativo, ao nível financeiro das instituições.

Assim, ocorreu uma redução da necessidade de recursos humanos associada à crise económica actual desencadeou uma vaga de desemprego nesta área. No entanto, a formação dos profissionais não poderá deixar de ser menosprezada, pois considero de extrema importância a aprendizagem. Só através desta poderemos perceber determinadas evidências, logo, um aspecto que penso ser muito positivo, foi tudo o que aprendi no estágio, bem como em todo o curso.

Bibliografia

- (1) Bain B., Células Sanguíneas – Um Guia Prático, 4ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2007.
- (2) Hoffbrand A., Pettit J., Moss P., Fundamentos em Hematologia, 4ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2004.
- (3) Brugnara C., Use of reticulocyte cellular indices in the diagnosis and treatment of hematological disorders, *Int J Clin Lab Res.*, 1998, 28 (1):1-11.
- (4) Brugnara C., Reticulocyte cellular indices: a new approach in the diagnosis of anemias and monitoring of erythropoietic function, *Crit Rev Clin Lab Sci.*, 2000 April, 37 (2):93-130.
- (5) Jacobs D., et al, Laboratory test handbook, 4.ª edição, Hudson, Ohio, Lexi-Comp Inc., 1996
- (6) Lima A., Soares J., Greco J., Galizzi J., Cançado J., Reacção do azul da Prússia, Métodos de laboratório aplicados à clínica, 6.ª edição, Editora Guanabara Koogan AS, 1985
- (7) Lewis S., Bain, B., Bates I., Dacie and Lewis Practical Haematology, 10ª edição, Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2006.
- (8) Amilachwari M., Barra V., Soriano G., Barra M., Regalado M., Theoretical and practical aspects of globular sedimentation velocity, *Bol Med Hosp Infant Mex*, 1990 May, 47 (5):355-60.
- (9) Burtis C.; Ashwood R., Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, 6ª Edição, London, W. B. Saunders Company, 2008.
- (10) Lovrencic M., Metelko Z., Standardization of the hemoglobin A1c reporting: transferring global consensus to the local community--special report, *Biochem Med.*, 2011, 21 (1):53-4.
- (11) Norma nº 33/2011 de 30/09/2011, Prescrição e determinação da hemoglobina glicada A1c.
- (12) Mercadanti M., Romero A., Lippi G., The measurement of hemoglobin A2 and F in stored whole blood samples, *Clin Lab.*, 2011, 57 (9-10):777-80.
- (13) Lamarre Y., Hemorheological risk factors of acute chest syndrome and painful vaso-occlusive crisis in children with sickle cell disease, *Hematologica*, 2012 Jun 11.
- (14) Daniels G., Bromilow I., Essential Guide to Blood Groups, 1st edition, UK: Blackwell Publishing, 2007.
- (15) Harvey G., David J., Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine, 11ª Edição, Oxford, Wiley-Blackwell, 2005.
- (16) Zhou X., Yan L., Zhao Y., Application of micro-column gel cards assay for direct Coombs test in diagnosis of autoimmune hemolytic anemia, *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 2012 Jan, 33 (1):31-3.

- (17) Solbeck S., Ostrowski S., Johansson P., A review of the clinical utility of INR to monitor and guide administration of prothrombin complex concentrate to orally anticoagulated patients, *Thromb J.*, 2012 Apr 30, 10 (1):5.
- (18) Mitsuguro M., *et al*, Usefulness of antithrombin deficiency phenotypes for risk assessment of venousthromboembolism: type I deficiency as a strong risk factor for venous thromboembolism, *Int J Hematol.*, 2010 Oct, 92 (3):468-73.
- (19) Mehrdad A., Schnaars H., Sibley J., Honor D., Determination of Plasma Fibrinogen Concentrations in Beagle Dogs, Cynomolgus Monkeys, New Zealand White Rabbits, and Sprague–Dawley Rats by Using Clauss and Prothrombin-Time–Derived Assays, *J Am Assoc Lab Anim Sci.*, 2011 November, 50 (6): 864-867.
- (20) Mackie I., Kitchen S., Machin S., Lowe G., Guidelines on fibrinogen assays, *British Journal of Hematology*, 2003, 121 (3): 396-404.
- (21) Quinn D., D-Dimers in the Diagnosis of Pulmonary Embolism, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1999 May, 5 (159): 1445-1449.
- (22) Ferreira, Wanda F. Canas, Sousa, João Carlos F., *Microbiologia*, Lisboa: Lidel, Edições Técnicas, 1998.
- (23) Murray R., Rosenthal S., Kobayashi S., Pfaller A., *Medical Microbiology*, 4th edition, USA: Mosby Elsevier Health Science, 2002.
- (24) Biomérieux, Folheto informativos de meios de cultura.
- (25) Correia C., Costa E., Pires A., Alves Madalena, Pombo G., Estevinho L., Etiologia das infecções do tracto urinário e sua susceptibilidade aos antimicrobianos, *Acta Med Port.*, 9 Maio 2007, (20): 543-549.
- (26) Ministério da Saúde – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Programa Nacional de Controlo da Infecção. Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em Bacteriologia, Programa Nacional de Controlo da Infecção, Observatório Nacional da Saúde, 2004.
- (27) Zhu M., *et al*, Analysis of the aetiology of diarrhoea in outpatients in 2007, Henan province, China, *Epidemiol Infect.*, 2012 Jun 7:1-9.
- (28) El-Sheikh S., El-Assouli S., Prevalence of viral, bacterial and parasitic enteropathogens among young children with acute diarrhoea in Jeddah, Saudi Arabia, *J Health Popul Nutr.*, 2001 Mar, 19 (1): 25-30.
- (29) Mitchell C., Manhart L., Thomas K., Fiedler T., Behavioral Predictors of Colonization with *Lactobacillus crispatus* or *Lactobacillus jensenii* after Treatment for Bacterial Vaginosis: A Cohort Study, *Infect Dis Obstet Gynecol.*, 2012 May 30.

- (30) Duncan S., Duncan C., The emerging threat of untreatable gonococcal infection, *N Engl J Med.*, 2012 May 31, 366 (22): 2136.
- (31) Joseph N., *et al*, Reliability of Kirby-Bauer disk diffusion method for detecting meropenem resistance among non-fermenting gram-negative bacilli, *Indian J Patho Microbiol.*, 2011 Jul-Sep, 54 (3): 556-60.