

Rosana Gonçalves da Cruz

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Gabriela Jorge da Silva e pela Dr^a. Ana Paula Melo e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais, António Cruz e Ana Cristina Gonçalves pelo apoio, carinho e pela oportunidade que me deram para a realização deste Mestrado.

Ao meu namorado, Telmo Baptista, pela compreensão e pelo apoio incondicional nos momentos mais difíceis e pela ajuda na realização da imagem de capa.

À Professora Doutora Leonor Martins Almeida, coordenadora do Mestrado, pela sabedoria, dedicação e disponibilidade prestada.

À Professora Doutora Gabriela Jorge da Silva, minha orientadora interna, pela atenção dedicada e pelo aconselhamento na revisão do relatório.

À Dr^a Ana Paula Melo, orientadora do estágio no laboratório, pela disponibilidade em orientar este estágio, pela transmissão do seu saber e pelo aconselhamento na elaboração e revisão do relatório.

À Dr^a Ana Paula Vasco, diretora do serviço, por me ter recebido como estagiária no seu serviço, pelo apoio e pelas palavras no momento certo.

Aos colaboradores do serviço de Medicina Laboratorial do HDFF, EPE pela simpatia, recetividade e pelo contributo na aquisição de experiência laboratorial.

Por último, presto um especial agradecimento aos colaboradores do sector da Microbiologia, pelo conhecimento, empenho, disponibilidade e paciência ao longo da minha aprendizagem.

ÍNDICE

ÍNDICE	VII
ÍNDICE DE TABELAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ABREVIATURAS	XI
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
INTRODUÇÃO	I
CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO	3
PROCESSAMENTO ANALÍTICO	7
1. Técnicas automatizadas	7
2. Técnicas manuais	9
ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	13
1. Hematologia	15
1.1. Metodologias Laboratoriais em Hematologia	15
1.2. Avaliação da Qualidade	16
1.3. Colheita, Transporte e Conservação das Amostras	16
1.4. Hemograma	17
1.5. Leucograma	19
1.6. Plaquetas	20
1.7. Reticulócitos	22
1.8. Esfregaço de Sangue Periférico	22
1.9. Estudo das anemias	23
1.10. Estudo das hemoglobinas	24
1.11. Pesquisa de Plasmodium sp.	25
1.12. Velocidade de Sedimentação	26
1.13. Coagulação e Hemostase	26
2. Microbiologia	29
2.1. Metodologias Laboratoriais em Microbiologia	29

2.2. Avaliação da Qualidade _____	31
2.3. Colheita, Transporte e Conservação das Amostras _____	31
2.4. Exame Microbiológico – Aspectos Gerais _____	32
2.5. Técnicas de Coloração _____	33
2.6. Exame Cultural _____	33
2.7. Amostras biológicas analisadas _____	34
2.7.1. Urina _____	34
2.7.2. Exsudato Vaginal e Uretral _____	36
2.7.3. Fezes _____	37
2.7.4. Expetoração e outras amostras respiratórias _____	40
2.7.5. Exsudatos Purulentos _____	42
2.7.6. Sangue _____	43
2.7.7. Líquido Cefalorraquídeo _____	44
2.7.8. Pele, Cabelos e Fragmentos de Unhas _____	45
2.8. Identificações e Antibiogramas _____	46
CONCLUSÃO _____	49
BIBLIOGRAFIA _____	51
ANEXOS _____	57

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I: Análises efetuadas pelo serviço de Medicina Laboratorial do HDFF, EPE. _____	4
Tabela II: Classificação das anemias tendo em conta as alterações dos parâmetros hematimétricos e exemplos de patologias associadas. _____	24
Tabela III: Os três tipos de hemoglobinas normais e a sua quantidade relativa, presentes no sangue do adulto. _____	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação gráfica do número de análises processadas, por sector, no Serviço de Medicina Laboratorial do HDFF, EPE. _____	4
Figura 2: Contador hematológico CELL-DYN Sapphire. _____	16
Figura 3: Esfregaço de sangue periférico evidenciando agregados plaquetares. _____	21
Figura 4: Reticulócito no sangue periférico corado por coloração supravital com azul de metileno. _____	22
Figura 5: Células do sangue periférico. _____	23
Figura 6: Vitek 2 Compact da Biomérieux. _____	29
Figura 7: Bact/Alert 3D da Biomérieux. _____	30
Figura 8: Pesquisa de <i>Streptococcus agalactiae</i> em meio Granada. _____	37
Figura 9: Coprocultura em meio SM2. _____	38
Figura 10: Diagnóstico laboratorial de <i>Campylobacter</i> sp. _____	40
Figura 11: Observação microscópica de BAAR em cordão corados pela técnica Ziehl-Neelsen. _____	42
Figura 12: Cultura em SGC e em lâmina gelosada Mycoline, evidenciando o crescimento de um fungo filamentosos. _____	46
Figura 13: Prova da optoquina em cultura presuntiva de <i>S. pneumoniae</i> , em GS. _____	47

ABREVIATURAS

ADE/RDW	Amplitude da Distribuição Eritrocitária/"Red cell Distribution Width"
AEQ	Avaliação externa da qualidade
AIQ	Avaliação interna da qualidade
aPTT	Tempo de Tromboplastina Parcial ativada
ATCC	"American Type Culture Collections"
BAAR	Bacilos ácido-álcool resistentes
CCDA	"Charcoal-Cefoperazone-Deoxycholate Agar"
CHGM	Concentração da Hemoglobina Globular Média
CLED	"Cystine Lactose Electrolyte Deficient"
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CO₂	Dióxido de Carbono
dL	Decilitros
fL	Fentolitros
g	Gramas
GC	Gelose Chocolate
GS	Gelose de Sangue
Hb	Concentração de hemoglobina
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
hCG	Gonadotrofina Coriônica humana (do inglês "Human Chorionic Gonadotropin")
HDFF, EPE	Hospital Distrital da Figueira da Foz, Entidade Pública Empresarial
HGM	Hemoglobina Globular Média
Ht	Hematócrito
INR	"International Normalized Ratio"
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
ISI	Índice de Sensibilidade Internacional
ITU	Infeção do Trato Urinário
K3-EDTA	Etilenodiaminotetracético tripotássico
KOH	Hidróxido de Potássio
L	litro

LCR	Líquido Cefalorraquídeo
mL	mililitro
mm	milímetro
MPV	Volume médio das Plaquetas (do inglês “mean platelet volume”)
n°	Número
°C	Grau celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAI	Pesquisa de Anticorpos Irregulares
PCR	Reação em cadeia da Polimerase (do inglês “Polymerase Chain Reaction”)
PDW	Varição de tamanho das Plaquetas (do inglês “Platelet Distribution Width”)
PFA	Teste da Função Plaquetária (do inglês “Platelet Function Analyser”)
pg	Picogramas
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês “Ribonucleic acid”)
SCA	Sabouraud Cloranfenicol Actidiona
SGC	Sabouraud com Gentamicina e Cloranfenicol
SGQ	Sistema de Gestão de Qualidade
SM2	Gelose Chrom ID Salmonella
SS	Gelose Salmonella Shigella
TDT	Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica
TP	Tempo de Protrombina
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
UK NEQAS	“United Kingdom National External Quality Assessment Service”
VDRL	“Venereal Disease Research Laboratory”
VGM	Volume Globular Médio
VS	Velocidade de sedimentação
%	Porcentagem

RESUMO

Este documento, aqui apresentado, refere-se ao meu estágio realizado no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital Distrital da Figueira da Foz (HDFF, EPE), no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas. O estágio teve como principais objetivos o conhecimento da rotina de um laboratório de análises clínicas, proporcionando-me a aquisição de conhecimentos técnicos e de prática laboratorial, assim como, a aplicação dos conhecimentos científicos teóricos adquiridos ao longo do mestrado. Após uma caracterização global do serviço e das suas valências, descrevo, de forma mais aprofundada, a minha atividade laboratorial, enquanto estagiária, nas valências de Hematologia e Microbiologia; apresentado as metodologias e parâmetros realizados nestes sectores.

Palavras-chave: Análises Clínicas, HDFF, Hematologia, Microbiologia.

ABSTRACT

This document refers to my internship at the Laboratory Medicine Service in the *Hospital Distrital da Figueira da Foz* (HDFF, EPE) under the master's degree in Clinical Analysis. The internship was aimed at knowing the routine of a clinical laboratory, giving me the acquisition of technical knowledge and laboratory practice, as well as the application of theoretical scientific knowledge acquired during the master's degree. After a global characterization of the service and its valences, describe, in more depth, my laboratory activity, while an intern in the valences of Hematology and Microbiology; presented the methodologies and parameters made in these sectors.

Keywords: Clinical Analysis, HDFF, Hematology, Microbiology.

INTRODUÇÃO

O presente relatório visa descrever o meu estágio no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital Distrital da Figueira da Foz (HDFF, EPE) sob a orientação da Dr.^a Ana Paula Melo. Este estágio foi realizado durante 6 meses, com uma duração de 700 horas, sendo repartido pelas valências de Hematologia, Imunohemoterapia, Bioquímica Clínica, Biologia Molecular e Microbiologia. Com a elaboração deste relatório pretendo descrever a minha atividade desenvolvida nas valências de Hematologia e Microbiologia. São, também, descritas as Avaliações Internas e Externas da Qualidade destas valências, de modo a minimizar os erros a que o processo analítico está sujeito.

O estágio curricular realizado teve como principais objetivos o conhecimento da rotina do Serviço de Medicina Laboratorial do HDFF, EPE; o que permitiu a aquisição de conhecimentos técnicos e de prática laboratorial, bem como, a aplicação dos conhecimentos científicos adquiridos ao longo do Mestrado em Análises Clínicas.

CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO

1. A Equipa

O serviço de Medicina Laboratorial do HDFF, EPE, sob a direção da Patologista Clínica Dr.^a Ana Paula Vasco, é constituído por cinco valências distintas: Hematologia, Imunohe-moterapia, Bioquímica Clínica, Biologia Molecular e Microbiologia. A equipa do serviço de Medicina Laboratorial é constituída por: um Patologista Clínico, três Técnicos Superiores de Saúde, catorze Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica (TDT), duas Assistentes Operacionais e dois Assistentes Técnicos.

2. A Planta

O serviço compreende duas áreas distintas:

- a) Área laboratorial: constituída por uma receção, uma sala de espera, três casas-de-banho, uma sala de colheitas, o gabinete de Direção, duas salas de arrumos e os espaços pertencentes às diferentes valências;
- b) Área social: constituída por dois vestiários, uma sala de convívio, uma casa-de-banho e um armazém.

3. Estatística

No ano de 2013, o serviço processou, diariamente, uma média de 1800 análises (Tabela I), das quais a grande maioria foram dirigidas ao sector de Bioquímica Clínica (Figura I). O serviço alargou, este ano, a sua resposta ao Centro de Medicina de Reabilitação da Região Centro – Rovisco Pais e aos centros de saúde.

Sector	2013	2014*
Bioquímica Clínica	569995	274999
Hematologia	35595	17396
Imunohemoterapia	39740	17942
Microbiologia	16812	8990
Biologia Molecular	509	280
Total:	662651	319607
Média Diária:	1815	2131

Tabela I: Análises efetuadas pelo serviço de Medicina Laboratorial do HFFF, EPE. Representação do número de análises processadas por cada sector do laboratório, durante os anos de 2013 e 2014. *Os dados relativos a este ano são referentes ao período de Janeiro a Maio.

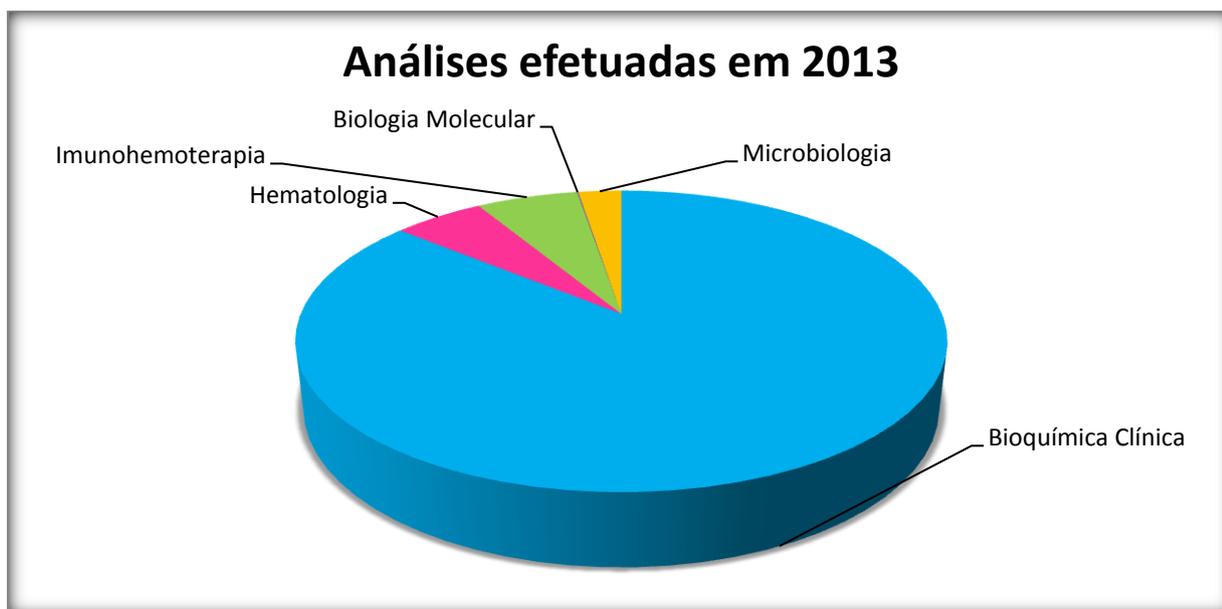


Figura 1: Representação gráfica do número de análises processadas, por sector, no Serviço de Medicina Laboratorial do HFFF, EPE. Os dados apresentados correspondem às análises efetuadas pelo serviço no ano de 2013.

4. Processo de Certificação

O serviço de Medicina Laboratorial do HFFF, EPE tem implementado um Sistema de Gestão de Qualidade (SGQ), em conformidade com a norma NP EN ISO 9001:2008 nas valências de Imunohemoterapia, Biologia Molecular, Coagulação e Virologia.

5. Operacionalização do Processo analítico

O processo analítico, desenvolve-se em três etapas: fase pré-analítica, fase analítica e fase pós-analítica.

a) Fase pré-analítica

No HDFF,EPE os parâmetros analíticos são pedidos mediante o preenchimento de uma requisição online (através do programa de gestão laboratorial – CliniData XXI) ou em requisição em papel, em que são devidamente selecionados os exames laboratoriais pretendidos. As requisições em papel chegam ao laboratório enviadas de outros serviços do hospital, juntamente com as amostras biológicas respetivas, através do sistema pneumático existente para transporte dos produtos biológicos. Estas requisições são analisadas pelos TDT para verificar a sua conformidade quanto à legitimidade das análises solicitadas e o seu preenchimento, para que posteriormente, prossigam à sua admissão, integração e triagem das mesmas no sistema informático. As requisições devem conter, além do pedido de análises, os seguintes requisitos:

- identificação do doente (nome completo, data de nascimento, morada, número (nº) de utente, nº de processo);
- serviço requisitante;
- data;
- assinatura do médico e o seu nº mecanográfico;
- tipo de amostra a colher e informação clínica relevante.

Uma vez reunidas estas condições, as análises pedidas são integradas de modo a gerir o processo de colheitas. Durante a colheita, os TDT, fazem-se acompanhar da respetiva requisição e das respetivas etiquetas, com um código de barras, que contém toda a informação que permite a identificação da amostra e do utente (nome, nº amostra, data de colheita, nº de episódio) e é com a sua leitura ótica que as amostras são identificadas para posteriormente serem processadas.

As análises enviadas para o exterior (protocolos com laboratórios sub-contratados) fazem-se acompanhar de um termo específico de autorização, que requer a validação da Direção Clínica.

Todas as amostras biológicas, devidamente identificadas e acompanhadas pela respetiva requisição, são triadas e separadas por cada sector correspondente, e posteriormente processadas.

b) Fase analítica

Dependendo dos parâmetros solicitados, assim a amostra é manuseada e processada pelo respetivo equipamento. Após o processamento, os resultados obtidos são transmitidos do auto-analisador para o sistema informático CliniData XXI. Através deste software, o clínico pode aceder rapidamente aos resultados analíticos do doente, acompanhando o seu historial analítico.

c) Fase pós-analítica

Após o processamento analítico, os resultados são validados pelo médico ou técnico superior de saúde responsável pelo sector que os pode disponibilizar ao clínico em suporte digital, em papel, ou ainda por telefone nos casos de emergência.

PROCESSAMENTO ANALÍTICO

O serviço dispõe de vários equipamentos automatizados e diferentes metodologias, quer automatizadas, quer manuais, para o processamento das diferentes análises efetuadas:

I. Técnicas automatizadas

I.1. Sector de Hematologia

Este sector é constituído por:

- CELL-DYN Shapphire e CELL-DYN 3700 (Abbot Laboratórios) – dois contadores celulares automáticos, que utilizam os processos de impedância, leitura ótica e fluorescência como metodologias para o processamento dos hemogramas.
- CELL-DYN SMS (Abbot Laboratórios) – equipamento para realização automática de esfregaços de sangue periférico e coloração pela técnica May Grünwald-Giemsa.
- ACL TOP 300 e o ACL TOP (Instrumentation Laboratory) – dois auto-analisadores para provas de coagulação que mensuram parâmetros como o Tempo de Protrombina (TP), o Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (aPTT) e o Fibrinogénio, usando a turbidimetria para deteção da formação do coágulo.
- PFA-100 (Platelet Function Analyser) (Siemens) – um analisador da função plaquetária que simula, *in vitro*, o complexo processo de hemostase primária.

I.2. Sector de Imunohemoterapia

Neste sector existem dois analisadores: o WADiana Compact (DG Gel, Clear Card Technology) que usa a aglutinação em gel como metodologia e o Immucor GAMMA (Echo Galileo) que utiliza a aglutinação em microplaca como metodologia. Estes dois auto-analisadores determinam o grupo ABO e Rh (D); e fazem a Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI) Eritrocitários. O auto-analisador WADiana Compact realiza, também, provas de compatibilidade em testes pré-transfusionais e Teste de Coombs (direto e indireto).

1.3. Sector de Biologia Molecular

O sector é composto por:

- Dois termocicladores para Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) em Tempo Real, o Light Cycler 1.5 Instrument (Roche) e o Rotor–Gene 3000 (Quilaban); e um Termociclador convencional, o P×2 Thermal Cycler (IZASA).
- Auto-LIPA (Bayer Diagnostics), equipamento automatizado para imunoensaios em linha.
- Extrator EZI Advanced (IZASA).

1.4. Sector de Bioquímica

O sector de Bioquímica Clínica dispõe de vários equipamentos automatizados de análises clínicas:

- UniCAP (Pharmacia & upJohn) – para Alergologia e Doença Celíaca, que usa o ensaio imunoenzimático como metodologia.
- SRS 20/11 (Vacuette) – para determinar, *in vitro*, a Velocidade de sedimentação (VS) pelo método Westergren.
- Minicap (ThermoFisher Scientific) – para realizar os Proteinogramas e determinar a Hemoglobina glicosilada (HbA1c), por eletroforese em gel de agarose.
- Urisys 2400 (Roche) – para realizar as Sumárias de Urina, com recurso a tiras Combur Test (Roche) (tiras reagente) pelos métodos de refletância (quantifica leucócitos, eritrócitos, nitritos, proteínas, glicose, corpos cetónicos, urobilinogénio, bilirrubina, pH e cor) e refratometria (determina o aspecto e a densidade).
- Dois auto-analisadores ABL 800 Flex (Radiometer) – para processar as gasometrias (mede os parâmetros: pH, gases no sangue, eletrólitos, oximetria e metabolitos) através de elétrodos seletivos.
- Architech i2000 SR (Abott Diagnostics) – para responder aos pedidos de virologia, com recurso ao imunoensaio por Quimioluminescência como metodologia. Atual-

mente, substituído pelo Cobas E411 (Roche) mediante imunoensaio por Eletroquimioluminescência.

- Cobas E411 (Roche) – processa a Hormonologia através de imunoensaio por Eletroquimioluminescência.
- Cobas Integra 800 (Roche) – para mensuração dos parâmetros bioquímicos como: ionograma (por potenciometria), enzimas e substratos (por espectrofotometria), proteínas (por turbidimetria), fármacos (por fluorescência polarizada). Atualmente, o serviço substituiu um dos Cobas Integra 800 pelo Cobas 6000 (Roche) que usa a mesma metodologia.

1.5. Sector de Microbiologia

Este sector conta com alguns equipamentos automatizados, tais como:

- Bact/Alert 3D (Biomérieux) – para incubação de culturas em frasco, que utiliza um sensor colorimétrico e a reflexão de luz para monitorizar o crescimento microbiano.
- Vitek 2 Compact (Biomérieux) – para identificação de espécies microbianas (por espectrofotometria) e respetivas suscetibilidades antimicrobianas (por turbidimetria) através de testes bioquímicos miniaturizados que se baseiam na alteração de cor dos indicadores de pH, devido ao metabolismo microbiano.

2. Técnicas manuais

O serviço dispõe das seguintes técnicas manuais para o auxílio no diagnóstico de várias patologias:

- Coloração citoquímica de Perls – para corar esfregaços de medula óssea e pesquisar a presença de sideroblastos; e para a pesquisa de hemosiderina na urina.

- Provas serológicas:
 - a) Reação Waaler Rose – para determinação do fator reumatóide, em doentes com suspeita de artrite reumatoide.
 - b) Reação de Widal – contribui para o diagnóstico da febre tifóide, verificando a aglutinação dos anticorpos do doente, em contato com os antígenos O (somático) e antígeno H (flagelar) das espécies de *Salmonella*.
 - c) Reação de Wright e Rosa de Bengala – para a detecção de Brucelose pela titulação de anticorpos específicos no soro.
 - d) Reação de Paul-Bunell – para o diagnóstico da Mononucleose Infeciosa por pesquisa da presença de anticorpos heterófilos contra hemácias de carneiro.
 - e) Teste “Venereal Disease Research Laboratory” (VDRL) – teste não-treponémico, para identificação de doentes com sífilis.

Uma das outras ferramentas laboratoriais que o serviço dispõe são os **testes rápidos**, frequentemente requisitados pelo serviço de urgência do hospital. Estes testes usam o ensaio imunocromatográfico *in vitro* como metodologia. O laboratório disponibiliza os seguintes testes:

- Clearview IM (Inverness medical) – para detecção qualitativa dos anticorpos heterófilos IgM da Mononucleose Infeciosa em sangue total, soro ou plasma.
- Drug-Clip Test 10 card (A. Menarini diagnostics) – para a detecção simultânea e qualitativa de várias drogas e metabolitos em amostras de urina.
- Visitect malaria combo (Omega diagnostics) – para a detecção qualitativa da Malária, fazendo a pesquisa de *Plasmodium Falciparum* e *Plasmodium ovale/vivax/malariae*.
- Visitect Lepto combo (Omega diagnostics) – para a detecção da Leptospirose. Faz pesquisa de anticorpos IgM específicos contra *Leptospira* sp. em amostra de sangue total, soro ou plasma.
- Legionella 20 V-Test (Coris Bioconcept) – para detecção do antígeno de *Legionella pneumophila* em amostras de urina.

- Letitest (Laboratórios Leti) – para deteção de Estreptococos do grupo A em zaragatoas de secreções nasofaríngeas.
- Surestep - One step hCG Pregnancy Test (Alere) – teste para deteção qualitativa da Gonadotrofina Coriónica humana (hCG) em amostras de urina, para confirmação precoce da gravidez.
- RSV (Coris Bioconcept) – para deteção do Virus sincicial respiratório em amostras nasofaríngeas.
- Inflú A & B - Respi-Strip (Coris Bioconcept) – para deteção dos virus Influenza A e Influenza B em zaragatoas, lavados ou aspirados de secreções nasofaríngeas.
- Rotavírus/Adenovírus Combo card (Laboratórios Leti) – para a pesquisa do antígeno dos vírus Rotavírus e Adenovírus em amostras fecais.
- FOB (Quilaban) – para pesquisa de sangue oculto em amostras fecais.
- C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE (Alere) – para deteção simultânea do antígeno de Glutamato Desidrogenase e das toxinas A e B de *Clostridium difficile* em amostras fecais.
- Pylori-Strip (Coris Bioconcept) – para a deteção *in vitro* do antígeno de *Helicobacter pylori* em amostras fecais.
- RIDASCREEN Campylobacter (R-Biopharm) – para a determinação qualitativa do antígeno de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em amostras fecais.

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

O meu estágio curricular no serviço de Medicina Laboratorial do HDFF, EPE teve como objetivo primário um conhecimento de toda a rotina laboratorial. Primeiramente, acompanhei o processo de receção do utente, serviço de colheitas, registo, distribuição e processamento das amostras. Numa segunda fase, procurei conhecer a rotina de cada sector, debruçando-me sobre as análises efetuadas, os equipamentos e metodologias usadas. Finalmente, procurei interpretar e questionar os resultados analíticos obtidos.

Após uma visão global dos diversos sectores, selecionei as valências de Hematologia e Microbiologia para maior aprofundamento de conhecimentos. Nestes sectores, pude desenvolver maior componente prática; o que permitiu maior conhecimento da rotina do sector, não descurando que todos os sectores laboratoriais são importantes para a avaliação e conseqüente interpretação dos resultados analíticos.

I. Hematologia

A hematologia do serviço de Medicina Laboratorial do HDFF, EPE é o sector onde se processam as amostras de sangue para os estudos hematológicos (realização do hemograma, observação de esfregaços de sangue periférico e de medula óssea, estudo das anemias e hemoglobinopatias; e avaliação da parasitemia) de forma a verificar alterações no número das células, alterações funcionais, quantitativas ou moleculares das proteínas que intervêm no processo hematopoiético, dando origem a situações patológicas.

O TDT deste sector, tem como responsabilidade a receção das amostras, a elaboração da lista de trabalho e o processamento das amostras (hemogramas, execução dos esfregaços de sangue periférico e respetiva coloração).

O sector conta com um Técnico Superior de Saúde que faz a avaliação microscópica dos esfregaços corados.

A validação biopatológica dos resultados fica a cargo da Dr^a Ana Paula Melo, que é a responsável pelo sector.

O meu estágio no sector de Hematologia abrangeu uma grande parte do processo analítico. Tive a oportunidade de rececionar as amostras e de manusear os equipamentos para o seu processamento. Segui o TDT nas manutenções diárias e semanais; bem como, na execução e coloração dos esfregaços de sangue periférico. A observação dos esfregaços foi acompanhada pelo Técnico Superior de Saúde. Por fim, pude acompanhar a interpretação e transmissão dos resultados ao clínico. Nesta secção do relatório abordarei o funcionamento do sector e o meu percurso enquanto estagiária.

I.1. Metodologias Laboratoriais em Hematologia

O sector de Hematologia dispõe de dois contadores celulares para execução do hemograma: CELL-DYN Sapphire (Figura 2) e CELL-DYN 3700. Estes auto-analisadores hematológicos contam e caracterizam as células sanguíneas recorrendo à combinação das técnicas de citometria de fluxo, impedância elétrica, dispersão ótica e fluorescência. Para um correto funcionamento e fiabilidade dos resultados, estes contadores celulares devem estar devidamente calibrados e perfeitamente controlados. A avaliação da qualidade nestes equipamentos

é realizada em duas vertentes: avaliação interna da qualidade (AIQ) e avaliação externa da qualidade (AEQ).



Figura 2: Contador hematológico CELL-DYN Sapphire.

1.2. Avaliação da Qualidade

A **AIQ** dos contadores automáticos é realizado todos os dias, de duas formas distintas:

- a) início da sessão de trabalho, com controlos (alto, baixo e normal) fornecidos pela casa comercial;
- b) com um replicado (uma amostra de sangue normal de um doente com valores conhecidos), processado várias vezes ao longo dia, de forma a testar a fidelidade e verificar o coeficiente de variação das amostras.

A **AEQ** a que o sector se propõe é a AEQ no âmbito do programa nacional do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) nos seguintes parâmetros: Contagem celular do sangue; Contagem de Reticulócitos; Morfologia do sangue periférico (com hipótese de diagnóstico) e Hemoglobinopatias (com caso clínico para hipótese de diagnóstico).

1.3. Colheita, Transporte e Conservação das Amostras

Ao sector de hematologia do Serviço, chegam amostras de sangue colhidas para tubos contendo o anticoagulante etilenodiaminotetracético tripotássico (K3-EDTA). O K3-EDTA é o anticoagulante escolhido para contagens de células sanguíneas, já que a sua capacidade de quelar o cálcio inibe a coagulação, permitindo a estabilidade celular (1). A colheita das amostras sanguíneas é dos procedimentos mais importantes que define a qualidade das mesmas, repercutindo-se no resultado analítico (2)(3)(4).

O transporte e entrega da amostra ao laboratório deve ser o mais célere possível, para garantir os melhores resultados (3)(4).

As amostras de sangue devem estar perfeitamente acondicionadas e devidamente identificadas, sempre acompanhados com a requisição do pedido de análises (4). Neste sector, antes de se iniciar o processamento da amostra verifica-se, se estão cumpridos estes requisitos.

Um erro durante a colheita, transporte ou conservação da amostra, inviabiliza a capacidade do sector de hematologia processar as amostras para a realização do hemograma e transmitir ao clínico resultados fidedignos (2)(3)(4).

1.4. Hemograma

O hemograma é um dos exames complementares de diagnóstico mais requisitados no HDFF, EPE. Este exame compreende a contagem das células do sangue periférico (eritrócitos, leucócitos e plaquetas), o cálculo dos índices hematimétricos e a contagem diferencial da população leucocitária (ver anexo 1) (5)(6). É considerado o exame, de rotina, fundamental no estudo da função hematopoiética.

Os contadores celulares automáticos, como o CELL-DYN Sapphire ou o CELL-DYN 3700, permitem ao sector determinar facilmente os parâmetros que constituem o hemograma (ver anexo 2):

1.4.1. Eritrograma

Corresponde à parte do hemograma que avalia a série vermelha, podendo evidenciar algumas alterações patológicas do sistema eritropoiético (5)(6). Para tal, são analisados os seguintes parâmetros:

- a) **Contagem de eritrócitos:** número de eritrócitos por unidade de volume de sangue total, expressa em $10^6/\mu\text{L}$.
- b) **Concentração da Hemoglobina (Hb):** representa a quantidade de hemoglobina por unidade de volume de sangue, expressa em g/dL. A Hb é quantificada pelos

métodos colorimétricos e espectrofotométricos. Este parâmetro permite conhecer a existência de anemia, caso os valores de Hb se apresentem menores do que o limite inferior de referência para a idade e sexo do paciente (5).

- c) **Hematócrito (Ht):** caracteriza a percentagem dos eritrócitos no volume total de sangue, expresso em % ou L/L. O Ht depende sobretudo do número, forma e tamanho dos eritrócitos presentes no sangue. Quantifica-se a partir da medição do número de eritrócitos e do Volume Globular Médio (VGM).

I.4.1.1. Índices hematimétricos:

Estes índices são determinados pela contagem global de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito; e auxiliam na caracterização das anemias (7).

- a) **Volume Globular Médio (VGM):** volume médio dos eritrócitos, expresso em fentolitros (fL). Representado pelo quociente entre o hematócrito e o número de eritrócitos:

$$VGM(fL) = \frac{Ht (\%) \times 10}{n^{\circ} \text{ de eritrócitos } (10^6 / \mu L)}$$

Este índice é de enorme importância na classificação das anemias em microcítica, normocítica ou macrocítica, sendo que se considera (7):

Anemia microcítica – diminuição do VGM;

Anemia macrocítica – aumento do VGM.

- b) **Hemoglobina Globular Média (HGM):** representa a quantidade de hemoglobina média existente em cada eritrócito, expressa em picogramas (pg). Representado pelo quociente:

$$HGM(pg) = \frac{Hb (g/dL)}{n^{\circ} \text{ de eritrócitos } (10^6 / \mu L)} \times 10$$

Recorre-se a este índice para referir se há hipocromia, normocromia ou hiperchromia. Sendo que:

Hipocromia – diminuição do HGM;

Hiperchromia – aumento do HGM.

- c) **Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM):** concentração média de hemoglobina num determinado volume de eritrócitos, expressa em g/dL ou g/L. Dada pelo quociente:

$$CHGM(g/dL) = \frac{Hb(g/dL)}{Ht(\%)} \times 100$$

- d) **Amplitude da Distribuição Eritrocitária/”Red cell Distribution Width” (ADE/RDW):** corresponde à amplitude de distribuição do tamanho dos eritrócitos, ou seja representa o índice de anisocitose eritrocitária, expresso em % (6)(7). Este índice indica o quanto a população de eritrócitos se desvia do tamanho médio:

- o **aumento** de RDW está associado a elevada anisocitose, refletindo a existência de eritrócitos de diferentes tamanhos, como na anemia sideropénica;
- a **diminuição** (ou normalidade) de RDW é encontrado em determinadas hemoglobinopatias, como por exemplo a talassémia.

1.5. Leucograma

O leucograma corresponde à contagem global das diferentes populações leucocitárias. Os leucócitos são células sanguíneas que medeiam as respostas imunológicas e incluem os leucócitos polimorfonucleares (granulócitos) e os leucócitos mononucleares. As células polimorfonucleares têm núcleo lobulado e possuem grânulos citoplasmáticos bem perceptíveis. Dependendo do tipo de grânulos, estes leucócitos são separados por três classes: neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Os leucócitos mononucleares são distinguidos em linfócitos e monócitos (6)(7)(8). Os analisadores automáticos do sector dão-nos a possibilidade de efetuar a contagem diferencial das cinco distintas populações leucocitárias (avaliadas conforme

o tamanho, a estrutura interna, os lóbulos nucleares e granularidade citoplasmática), sendo que indicam as suas quantidades relativas, em percentagem e em valor absoluto, e fornecem informações da existência de células imaturas. Alterações no número de leucócitos podem estar associados a diversas situações patológicas:

- **Leucocitose:** quando o número de leucócitos aumenta para valores¹ superiores a $10 \times 10^9/L$. Pode ser desencadeada por processos infecciosos/inflamatórios, traumatismo e leucemias. Em infeções bacterianas é normal ocorrer aumento dos neutrófilos, nas infeções virais verifica-se aumento de linfócitos e nas infeções parasitárias e alergias observa-se um aumento de eosinófilos (6)(7)(8)(9)(10);
- **Leucopenia:** quando o número de leucócitos diminui para níveis inferiores a $4 \times 10^9/L$. A leucopenia está bastante relacionada com o uso de fármacos (que afetam a produção de leucócitos), as terapêuticas imunossupressoras e com imunodeficiências (8)(11)(12).

1.6. Plaquetas

As plaquetas, desenvolvidas na medula óssea, são fragmentos citoplasmáticos das suas células precursoras – os megacariócitos. As plaquetas formam agregados que, juntamente, com os fatores de coagulação bloqueiam as lesões vasculares e traumas tecidulares, travando a hemorragia. No sangue periférico, estas células apresentam um tempo médio de vida de cerca de dez dias. As plaquetas possuem grânulos que contêm os fatores de coagulação necessários ao processo de hemostase. Assim, plaquetas agranulares não são funcionais (6)(7)(8).

Os contadores celulares automáticos, do sector, usam os métodos de dispersão ótica e a impedância elétrica para a contagem e determinação do tamanho das plaquetas. Desta forma, determinam o volume médio das plaquetas (MPV) e a variação de tamanho (PDW). A contagem do número de plaquetas é dada por unidade de volume de sangue e alterações quantitativas são designadas por:

¹ Os valores referidos no documento são valores genéricos, mas de referência do serviço, considerando que podem apresentar oscilações em função da idade ou sexo (ver Anexo I).

- **Trombocitose:** o número de plaquetas aumenta para valores superiores a $450 \times 10^9/L$ (pode estar relacionada com uma situação reativa ou de inflamação crônica, hemorragia ou neoplasia) (6)(7);
- **Trombocitopenia:** diminuição do número de plaquetas para níveis inferiores a $150 \times 10^9/L$ (pode estar relacionada com neoplasias medulares, infecções virais e como consequência da toxicidade de fármacos)(6)(7)(13).

Em situações de trombocitopenia deve-se averiguar a presença de coágulos na amostra e observar o esfregaço de sangue periférico para detetar possíveis agregados plaquetares (figura 3) (7).

- **Agregados Plaquetares** – resultam da ativação das plaquetas promovendo a libertação dos grânulos e consequentemente a agregação plaquetar. Desta forma, a contagem de plaquetas encontra-se falsamente diminuída. Assim, sempre que se suspeite desta condição, deve-se fazer a observação microscópica do esfregaço de sangue periférico e caso se confirme a presença de agregados plaquetares deverá ser solicitado a repetição da colheita em citrato ou heparina (14).

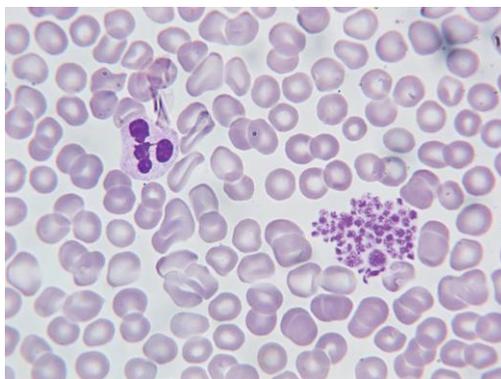


Figura 3: Esfregaço de sangue periférico evidenciando agregados plaquetares (15).

1.7. Reticulócitos

Os reticulócitos são eritrócitos imaturos, circulantes no sangue periférico, desprovidos de núcleo mas com ácido ribonucleico (RNA) ribossomal e algumas mitocôndrias (figura 4). É um parâmetro de grande interesse no diagnóstico laboratorial das anemias, já que permite distinguir anemias de causa medular de anemias de causa extra-medular(16)(17). No sector de hematologia a contagem de reticulócitos é efetuada no contador CELL-DYN Sapphire e feita a sua observação microscópica através do esfregaço de sangue periférico. Em situações normais, a contagem de reticulócitos é aproximadamente 1 a 2 % dos eritrócitos totais. Uma falha na produção de eritrócitos

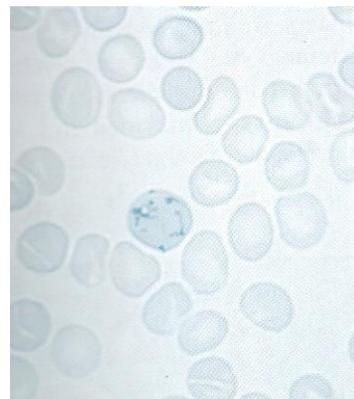


Figura 4: Reticulócito no sangue periférico corado por coloração supravital com azul de metileno (6).

reflete-se numa contagem baixa de reticulócitos, contrariamente a uma reticulocitose (aumento dos reticulócitos) que parece estar presente na anemia e reflete a sua intensidade; e sugestiva de hemólise que estimula a produção medular de eritrócitos. Contudo, a reticulocitose pode ser originada por situações pós-hemorrágicas (7)(16).

1.8. Esfregaço de Sangue Periférico

Após o processamento das amostras nos contadores celulares automatizados e a interpretação dos resultados obtidos, avalia-se a necessidade da execução do esfregaço de sangue periférico tendo em consideração a história clínica do doente, informações acerca do diagnóstico clínico provável e a distribuição das células no histograma da contagem nos equipamentos.

O esfregaço de sangue periférico é essencial na avaliação hematológica, revelando possíveis alterações de cor (por exemplo: hipocromia e hipercromia) nas dimensões e na morfologia dos elementos celulares (figura 5) (16). O esfregaço é feito através do espalhamento de uma gota de sangue sobre a superfície de uma lâmina, de forma a conseguir uma fina película de sangue para que não haja sobreposição das células (6)(7)(16)(17).

No sector de hematologia, os esfregaços e respetiva coloração são executados pelo equipamento CELL-DYN SMS. Os esfregaços após corados (pelo método de May Grünwald-Giemsa) são observados ao microscópio, tendo em conta (6)(7)(16)(17)(18):

- Alterações morfológicas das plaquetas e presença de agregados plaquetares;
- Alterações morfológicas dos eritrócitos (forma, tamanho, cor, presença de “rouleaux”, de células nucleadas ou de corpos de inclusão);
- Contagem das diferentes populações leucocitárias;
- Alterações morfológicas da série leucocitária (tamanho, aspecto da cromatina, forma do núcleo, presença ou não de nucléolo(s), relação núcleo/citoplasma, granularidade e basófilia do citoplasma);
- Presença de precursores das linhagens celulares mielóide, linfóide e eritroide;
- Pesquisa de parasitas do sangue (exemplo: *Plasmodium* sp).

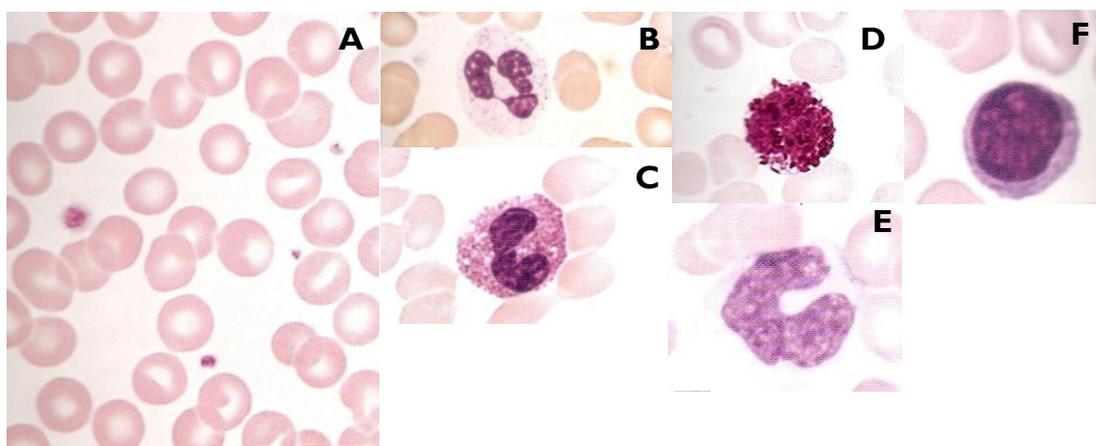


Figura 5: Células do sangue periférico. A: Eritrócitos; B: Neutrófilo; C: Eosinófilo; D: Basófilo; E: Monócito; F: Linfócito (6).

1.9. Estudo das anemias

A anemia é definida pela diminuição da Hb do sangue abaixo dos valores de referência determinados para o sexo e idade. Na anemia, além da diminuição da Hb, é possível que o hemograma revele outros parâmetros diminuídos como por exemplo, a contagem de eritrócitos e o hematócrito. A anemia pode ser consequência de hemorragia, defeito de produção ou de hemólise. Aspectos clínicos como sintomas (cefaleias, fraqueza e/ou dispneia) e sinais clínicos (palidez das mucosas e/ou icterícia) podem ser indicativas de um estado anémico e condição para a realização de exames laboratoriais que confirmem a anemia. No sector, o diagnóstico laboratorial das anemias é realizado tendo em conta (6)(7)(8)(19)(20):

- a avaliação do hemograma;
- a interpretação dos parâmetros hematimétricos (classifica as anemias em microcíticas, normocíticas e macrocíticas) (tabela II);
- a observação do esfregaço de sangue periférico;
- a contagem de reticulócitos (na anemia hemolítica);
- a determinação dos parâmetros: ferritina, vitamina B12 e ácido fólico.

Classificação das anemias

Parâmetro	Alteração	Patologia associada
MCV	Microcítica	anemia ferripriva anemia sideroblástica Talassémia
	Normocítica	anemia hemolítica
	Macroscítica	anemia megaloblástica (deficiência em ácido fólico) anemia perniciosa (deficiência em vitamina B12) Hepatopatias
HCM	Hipocromia	Talassémia secundária a déficit de ferro
	Normocromia	anemia hemolítica
	Hipercromia	esferocitose hereditária

Tabela II: Classificação das anemias tendo em conta as alterações dos parâmetros hematimétricos e exemplos de patologias associadas. Adaptado (7).

I.10. Estudo das hemoglobinas

As hemoglobinas normais presentes no sangue do adulto são: hemoglobina A (Hb A), hemoglobina fetal (Hb F) e hemoglobina A₂ (Hb A₂) (Tabela III). A principal hemoglobina

existente, no adulto, é a Hb A. Contudo, no embrião e feto a Hb F está presente em maior quantidade (6)(21).

Hemoglobinas normais no sangue de adultos

	Hb A	Hb F	Hb A ₂
Quantidade normal (%)	96-98	0,5-0,8	1,5-3,2

Tabela III: Os três tipos de hemoglobinas normais e a sua quantidade relativa, presentes no sangue do adulto. Adaptado (7).

A alteração quantitativa ou qualitativa da síntese de globina está implicada em doenças hereditárias, como por exemplo: a talassémia (α ou β) e variantes da hemoglobina (Hb S, Hb C, Hb D, Hb E) (6)(21)(22).

No sector de Hematologia, tive a oportunidade de observar, o diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias. O estudo eletroforético das hemoglobinas é realizado no auto-analisador Minicap, que faz a separação das diferentes frações da hemoglobina. A interpretação do gráfico com as frações globínicas, do hemograma, do esfregaço de sangue periférico e da cinética do ferro são essenciais para o estudo das hemoglobinopatias (7).

I.11. Pesquisa de *Plasmodium* sp.

Plasmodium sp. é o agente etiológico da Malária, frequentemente associada a zonas tropicais. Este parasita é transmitido ao Homem, através da fêmea do mosquito *Anopheles*, que cresce e multiplica-se primeiramente no fígado e posteriormente invade os eritrócitos (23)(24). A Malária pode ser transmitida pelas quatro espécies de *Plasmodium* – *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. ovale*; sendo o parasitismo por *P. falciparum* a forma mais severa de Malária (7)(24). Estas espécies podem ser distinguidas pelas suas características específicas quando se observam os eritrócitos parasitados ao microscópio. No sector, a pesquisa de *Plasmodium* sp. é feita com recurso a um teste rápido para a deteção qualitativa da Malária, fazendo a pesquisa do antigénio de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium ovale/vivax/malariae*. Contudo, é realizado também um esfregaço de sangue periférico, corado pela técnica May Grünwald-Giemsa, com intuito de confirmar a parasitémia efectuando-se a observação

microscópica dos elementos parasitários dentro dos eritrócitos, permitindo distinguir a espécie de *Plasmodium* sp. (7)(25).

I.12. Velocidade de Sedimentação

A Velocidade de Sedimentação (VS) é o parâmetro que corresponde à velocidade a que sedimentam os eritrócitos no plasma, medida em milímetros (mm) num determinado intervalo de tempo (mm/h) (7).

No serviço de Medicina laboratorial recorre-se a um método automatizado para medição da VS. O equipamento automatizado *SRS 20/II* analisa a VS globular dos eritrócitos em tubo primário com citrato de sódio.

A VS é considerada um parâmetro inespecífico, pois pode apresentar variações em diversos processos patológicos. No entanto, é um forte indicador de um processo inflamatório, em que a quantidade de fibrinogénio no sangue aumenta exponencialmente levando à aglomeração dos eritrócitos (fenómeno de “rouleaux”) que conduz ao aumento da VS. Várias condições patológicas podem estar associadas ao aumento da VS, tais como: inflamação aguda ou crónica, no período de convalescença do processo infeccioso, no pós-operatório, no mieloma múltiplo, anemia, febre reumática e artrite reumatóide. Todavia, é importante salientar que a VS varia consoante o sexo e a idade e em determinadas situações fisiológicas, tais como a menstruação e a gravidez em que a VS apresenta-se aumentada. Por outro lado, a VS pode estar diminuída em situações de policitemia, anemia falciforme, deficiência cardíaca congestiva e excesso de fibrinogénio plasmático e globulina (7)(16)(26).

I.13. Coagulação e Hemostase

O sistema hemostático, em caso de lesão vascular, tem a capacidade de limitar a hemorragia, permitindo a reparação dos tecidos, através de um conjunto de reações por interações entre a parede vascular, as plaquetas e os fatores de coagulação. A hemorragia pode estar associada a anomalias herdadas ou adquiridas do próprio sistema hemostático. Por outro lado, uma ativação desregulada do sistema hemostático pode estar implicada em trombozes, embolias e comprometer a irrigação de órgãos vitais (7)(16).

Deste modo, quando ocorrem situações de lesão do tecido vascular desencadeiam-se os mecanismos de controlo da hemorragia, podendo considerar-se (7)(16):

- **Hemostase primária:** há constrição do vaso sanguíneo, seguida de adesão plaquetar, agregação plaquetar e posterior libertação de grânulos, levando à formação de um coágulo plaquetar no local da lesão.
- **Hemostase secundária:** ativada pelas reações do sistema de coagulação plasmática culminando com a produção de fibrina. Este processo inclui a coagulação sanguínea e a fibrinólise.

1.13.1. Avaliação laboratorial da hemostase

As amostras de sangue que chegam ao sector para estudo da hemostase, são colhidas para um tubo com o anticoagulante citrato de sódio. Posteriormente, após centrifugação para obtenção do plasma, são processadas em tubo primário no ACL TOP 300. Este auto-analisador permite determinar parâmetros como: Tempo de Protrombina (TP), o Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (aPTT) e o Fibrinogénio.

1.13.1.1. Tempo de Protrombina (TP)

O TP permite avaliar a via extrínseca e a via comum da cascata de coagulação. Este parâmetro é frequentemente usado na monitorização da terapêutica com anticoagulantes orais, despiste de alterações da coagulação (análise de rotina para pré-operatório) e da avaliação da função hepática (7)(16). O TP, é dado em segundos, que corresponde ao tempo consumido pela amostra de plasma para coagular na presença de tromboplastina e de cloreto de cálcio.

Devido ao uso de diferentes tromboplastinas utilizadas para a determinação do TP, os resultados obtidos, são padronizados segundo um valor de referência internacional de cada tromboplastina, o Índice de Sensibilidade Internacional (ISI), utilizado no cálculo de uma razão normalizada, o “International Normalised Ratio” (INR), segundo a fórmula:

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

O INR é utilizado na monitorização terapêutica com anticoagulantes orais. Se o valor de INR estiver bastante superior ao limite superior de referência, indica que a anticoagulação do doente está afetada e apresenta maior risco de hemorragias (7).

1.13.1.2. Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (aPTT)

O aPTT permite avaliar a via intrínseca e a via comum da cascata de coagulação. É utilizado para a monitorização da terapêutica heparínica e na investigação de causas hemorrágicas hereditárias, tais como a hemofilia e a doença de von Willebrand (7)(16)(27)(28). Na determinação do aPTT, o plasma é colocado na presença de cefalina², de um ativador de contacto e cloreto de cálcio. O tempo consumido em segundos para a coagulação do plasma representa o aPTT.

1.13.1.3. Fibrinogénio

Este parâmetro avalia a capacidade de conversão de fibrinogénio solúvel num coágulo de fibrina insolúvel, pela ação da trombina. A avaliação turbidimétrica do fibrinogénio faz-se a partir do coágulo obtido para o Tempo de Protrombina, por extrapolação a partir da curva de coagulação obtida. Para uma avaliação mais correta determina-se o fibrinogénio pelo método de *Clauss*. Pode estar diminuído em situações de coagulação intravascular disseminada ou na ativação da fibrinólise. O seu aumento parece estar associado a processos infecciosos e/ ou inflamatórios, já que é uma proteína de fase aguda (16).

² Tromboplastina parcial incapaz de ativar a via extrínseca.

2. Microbiologia

O sector de Microbiologia do serviço de Medicina Laboratorial do HDFF, EPE compreende os estudos bacteriológicos, micológicos e/ou parasitológicos. Aqui são processados vários tipos de amostras biológicas, dentro das quais se incluem urina, exsudatos, expectoração, lavados brônquicos, líquidos biológicos [pleurais, ascítico, Líquido Cefolorraquídeo (LCR)], sangue, fezes e escamas de pele.

Na rotina deste sector, o TDT tem como responsabilidade a receção das amostras, a elaboração do registo das amostras e listas de trabalho, a verificação dos produtos em falta, e o processamento das amostras (sementeira nos meios apropriados, execução dos esfregaços e respetiva coloração). O sector conta com dois Técnicos Superiores de Saúde que fazem a avaliação macroscópica das culturas semeadas nos dias anteriores e dos resultados das identificações e antibiogramas. Este processo é realizado durante o período da manhã, com a colaboração do TDT que as processou. Os Técnicos Superiores de Saúde são igualmente responsáveis pela avaliação e interpretação dos exames diretos a fresco e após coloração.

O meu estágio no sector da Microbiologia contemplou todo o processo do estudo microbiológico, desde a receção das amostras à interpretação e transmissão dos resultados ao clínico.

2.1. Metodologias Laboratoriais em Microbiologia

O sector de Microbiologia está equipado com um aparelho Vitek 2 Compact (Biomérieux) (Figura 6), que apresenta um sistema automatizado de identificação de microrganismos.



Figura 6: Vitek 2 Compact da Biomérieux.

mos e respetivo antibiograma. A identificação de espécies microbianas é feita através de cartas com um sistema miniaturizado dos testes bioquímicos convencionais. O aparelho faz uma leitura automática, por espectrofotometria, da alteração de cor promovida pela mudança de pH devido ao metabolismo microbiano. O antibiograma é feito com recurso a cartas contendo vários antibióticos. É determinada a Concentração Mínima Inibitória (CMI) e os resultados são interpretados como suscetível, intermédio ou resistente.

Contudo, para identificações de espécies bacterianas para as quais o VITEK 2 Compact não contém cartas, ou em casos de prevalência rara que não se justifique o uso de cartas VITEK, o laboratório de microbiologia usa a metodologia API. Esta metodologia é realizada em galerias compostas por diversas cúpulas, que contêm meio de cultura e substratos desidratados permitindo a metabolização dos substratos, pelas bactérias, evidenciando-se por reações colorimétricas ou por turvação.

Este sector tem um sistema automatizado para culturas em frasco, o sistema Bact/Alert 3D (Biomérieux) (figura 7). Este auto-analisador permite a incubação, agitação e monitorização dos frascos contendo a amostra do doente inoculados em meios aeróbios ou anaeróbios. O Bact/Alert 3D faz leituras periódicas de forma a detetar crescimento microbiano. O sistema usa um sensor colorimétrico e a reflexão da luz para monitorizar a produção de dióxido de carbono (CO_2), originado pelo desenvolvimento microbiano e metabolismo dos substratos do meio de cultura.



Figura 7: Bact/Alert 3D da Biomérieux.

2.2. Avaliação da Qualidade

Para garantir a qualidade do sector de Microbiologia, é importante a implementação de controlos de qualidade, quer internos, quer externos. A avaliação da qualidade assegura a exatidão e fiabilidade da metodologia realizada no laboratório de Microbiologia (isolamentos, identificações e antibiogramas).

A **AIQ** do sector de Microbiologia é realizado semanalmente, com estirpes padrão de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* [“American Type Culture Collections” (ATCC)], fornecidas pela casa comercial. Este controlo é processado com as técnicas usadas na rotina laboratorial para identificações e antibiogramas. Realiza-se, ainda, uma sementeira controlo, em gelose de sangue (GS), de forma a verificar a esterilidade da solução utilizada nas suspensões bacterianas para identificações e antibiogramas.

O sector está inscrito num programa de **AEQ** do “United Kingdom National External Quality Assessment Service” (UK NEQAS), para as áreas de bacteriologia e parasitologia. Esta avaliação requer o processamento de amostras desconhecidas liofilizadas, usando os procedimentos laboratoriais do sector. A AEQ de bacteriologia consiste em exercícios (com casos clínicos) para identificação de agentes patogénicos e respetivos antibiogramas. A AEQ de parasitologia consiste, também, em exercícios (com casos clínicos) com amostras para a pesquisa de parasitas. Após o envio dos resultados, o UK NEQAS envia para o laboratório o relatório com a apreciação.

2.3. Colheita, Transporte e Conservação das Amostras

Para garantir um bom resultado é necessário que a colheita da amostra biológica respeite os procedimentos estabelecidos pelo laboratório, em conformidade com o seu Manual de Colheitas. A qualidade da amostra influencia diretamente o resultado obtido. Uma falha numa destas etapas (colheita, transporte e conservação da amostra), está relacionada com a incapacidade de isolamento do agente etiológico responsável pela infeção e com o crescimento de outros microrganismos contaminantes.

A colheita da amostra biológica deve ser feita, sempre que possível, antes de iniciar a antibioterapia e no local anatómico onde haja maior probabilidade de isolamento do micror-

ganismo patogénico. O material e recipiente usado para a colheita deve ser estéril, de forma a minimizar possíveis contaminações (por exemplo, em técnicas invasivas, se a colheita não for asséptica, a amostra colhida poderá ser contaminada com a flora normal do doente). A qualidade do resultado e a sua interpretação podem também ser afetados se o volume de amostra for insuficiente para a análise microbiológica (29).

O transporte e entrega da amostra ao laboratório deve ser o mais célere possível, de maneira a garantir a sobrevivência e o isolamento dos microrganismos e prevenir o crescimento de outros menos exigentes. No caso de não ser possível o transporte ou processamento imediato da amostra, esta deve ser preservada com refrigeração (2 a 8°C) (29).

Os produtos biológicos devem estar perfeitamente acondicionados e devidamente identificados, sempre acompanhados com a requisição clínica. Neste sector, antes de se iniciar o processamento da amostra verifica-se, se estão cumpridos estes requisitos. O sector tem estabelecido um conjunto de regras para trabalhar em condições de assepsia, de forma a minimizar contaminações. Apresenta também um protocolo relativo à escolha dos meios de cultura, em função do tipo de amostra e da informação clínica, de forma a conseguir um bom isolamento do microrganismo responsável pela infeção.

2.4. Exame Microbiológico – Aspectos Gerais

O exame microbiológico dos diversos produtos biológicos, compreende um exame direto e um exame cultural. O exame direto pode ser macroscópico ou microscópico (direto a fresco ou direto após coloração) (30):

- **Exame Macroscópico** – permite a observação, a fresco, do produto para análise, tendo em atenção características como: o cheiro, a cor e o aspecto. Esta observação pode auxiliar na orientação da pesquisa microbiológica de um determinado agente etiológico.
- **Exame Microscópico direto** – possibilita conhecer, ao microscópio ótico, a flora microbiana presente na amostra e observar o tipo e quantidade de células presentes (leucócitos, eritrócitos e células epiteliais) e pode ser realizado em duas vertentes:

- a) **Exame Microscópico direto a fresco** – este exame é feito com uma suspensão da amostra biológica em soro fisiológico e observada ao microscópio ótico.
- b) **Exame microscópico direto após coloração** – durante o processamento da amostra, faz-se um esfregaço do produto a analisar, em lâmina de vidro. O esfregaço, depois de fixado à chama, é corado pela técnica de Gram ou pela técnica de Ziehl-Neelsen. A escolha da coloração depende do tipo de amostra e pedido do clínico.

2.5. Técnicas de Coloração

Os métodos de coloração são técnicas importantes em laboratórios de microbiologia, uma vez que proporcionam uma perspetiva da flora bacteriana da amostra biológica, potencialmente associada a infeções (30).

O sector de Microbiologia do serviço de Medicina Laboratorial, tem definido os procedimentos de coloração, em função do tipo de amostra e exame requisitado pelo clínico. Por norma, são coradas duas lâminas por amostra, uma para observação imediata e outra de reserva.

- Coloração de Gram – permite diferenciar bactérias Gram-positivas de Gram-negativas (30).
- Coloração Ziehl-Neelsen – permite distinguir bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR) de outras bactérias. Realizada em todos os pedidos de exame para pesquisa de Mico-bactérias (30).

2.6. Exame Cultural

As amostras biológicas, dependendo da sua natureza e do objetivo de estudo, são semeadas nos meios de cultura adequados e incubados em estufa a temperaturas e atmosferas específicas, de acordo com as necessidades particulares de cada microrganismo, de forma a permitir uma adequada avaliação do crescimento microbiano (28). Durante a interpretação macroscópica da cultura deve-se ter em conta:

- Características morfológicas das colónias, como: forma, tamanho, contorno, cor, brilho, rugosidade, densidade, odor e predomínio de determinado tipo de colónia (exemplo: odor característico de *Pseudomonas* spp.);
- Alterações do meio em redor das colónias, que caracterizam uma atividade metabólica específica do microrganismo (exemplo: α e β hemólise em gelose de sangue);
- Alterações de cor nos meios diferenciadores, em consequência do metabolismo bioquímico do microrganismo [exemplo: alteração da cor azul do meio de “Cystine Lactose Electrolyte Deficient” (CLED) para cor amarela, devido ao metabolismo de bacilos Gram-negativo fermentadores da lactose que alteram o pH do meio] (31).

A apreciação global do exame direto, do esfregaço corado e do exame cultural, define o procedimento seguinte.

2.7. Amostras biológicas analisadas

2.7.1. Urina

As infeções do trato urinário (ITU) são das infeções mais comuns no Homem. Normalmente, o trato urinário é resistente à colonização por bactérias patogénicas. Porém, pode ocorrer invasão, por via ascendente, de bactérias comensais de outra zona do corpo (normalmente por bactérias da flora intestinal), causando infeção urinária aguda. Os agentes etiológicos frequentemente associados a ITU nas crianças e adultos, são as Enterobactérias, em particular: *Escherichia coli* (a mais comum), *Proteus* spp. e *Klebsiella* spp.; e ainda outras bactérias Gram-negativas, como a *Pseudomonas aeruginosa* e algumas Gram-positivas, como *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus* ou *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. As leveduras, como *Candida albicans* podem também estar associadas a ITU, principalmente em doentes imunodeprimidos. No entanto, o seu isolamento em amostras de urina, só deve ser valorizado se as culturas estiverem puras, sem crescimento bacteriano, dado que esta levedura coloniza a mucosa genital (29)(32)(33).

A todas as amostras de urina que chegam ao laboratório de microbiologia são efetuados um exame microscópico a fresco do sedimento urinário e um exame cultural:

a) Sedimento urinário

Durante a observação do sedimento urinário deve-se avaliar a presença de:

1. Leucócitos: a presença de mais de três a seis leucócitos/campo poderá indicar uma ITU bacteriana, geralmente confirmada no exame cultural, já que existe uma boa correlação entre leucocitúria e bacteriúria. Contudo, há que ter em atenção que leucocitúria nem sempre está associada a ITU, podendo ser detetada noutras patologias, da mesma forma que pode haver bacteriúria sem leucocitúria (infecções assintomáticas ou em doentes imunodeprimidos) (34).
2. Bactérias: uma bacteriúria moderada a abundante pode sugerir uma ITU bacteriana. Contudo, poderá estar associada a contaminação da amostra ou ser proveniente da colonização da uretra pela flora normal (34).
3. Células leveduriformes: apesar de pertencerem à flora normal do trato urinário inferior, poderão estar relacionadas com infeção fúngica (principalmente em doentes imunodeprimidos) (34).
4. Eritrócitos: a hematúria pode ser uma manifestação de infeção do sistema urinário, como por exemplo a glomerulonefrite ou necrose tubular aguda (35)(36).
5. Células epiteliais, Cristais e Cilindros.

b) Exame Cultural

As urinas, após homogeneização, são semeadas em meio de CLED e Gelose de sangue (GS) por esgotamento total do inóculo. As sementeiras são incubadas na estufa a 37°C, em aerobiose, de 18h a 24h. Em amostras pediátricas, a sementeira é feita em lâmina gelosada (dois meios: CLED e MacConkey), por imersão da lâmina gelosada na urina.

Na observação das sementeiras, deve-se avaliar o crescimento bacteriano tendo em conta o que foi observado no exame microscópico do sedimento urinário. Se a cultura apresentar crescimento bacteriano, prossegue-se com uma contagem de unidades formadoras de colónias (UFC). Quando a cultura é pura e a contagem de UFC é igual a 10^5 /mL deve-se partir para a identificação do microrganismo em causa. Uma cultura 10^5 /mL polimicrobiana (com três ou mais tipos de colónias) é dada como 10^5 /mL polimicrobiana e deve ser repetida nova colheita. Apesar das ITU serem causadas, normalmente, apenas por uma espécie bacte-

riana, culturas com duas espécies diferentes e com um exame do sedimento urinário sugestivo de infecção (presença de bactérias e leucócitos), procede-se ao isolamento dos dois agentes bacterianos.

Em amostras de urina colhidas por punção vesical, valoriza-se qualquer que seja o crescimento de espécie (s) bacteriana (s), independentemente da contagem de UFC/mL.

As identificações e antibiogramas são realizados de forma automatizada, pelo VITEK 2 Compact, seguindo a metodologia para identificações e antibiogramas.

2.7.2. Exsudato Vaginal e Uretral

A flora normal da vagina apresenta uma grande variedade de bactérias e leveduras, principalmente *Lactobacillus* spp., que exercem um efeito protetor sobre a mucosa vaginal, ao manterem o pH ácido. O desequilíbrio da flora normal da vagina está relacionado com a diminuição de *Lactobacillus* spp. e a proliferação da flora existente, como *Gardnerella vaginalis* (associada à vaginose bacteriana) e *Candida* spp. (nas candidíases). Porém, outros microrganismos não pertencentes à flora normal podem provocar infecções vaginais, tais como: *Neisseria gonorrhoeae* ou *Trichomonas vaginalis* (29)(37).

Os exsudatos vaginais são colhidos por zaragatoa e enviados para o laboratório. Este tipo de amostras chegam ao laboratório e são sujeitas a exames diretos e culturais, dependendo do pedido do clínico:

a) Exame direto microscópico

- Exame direto a fresco do esfregaço, entre lâmina e lamela, para pesquisa de *Trichomonas vaginalis*;
- Exame do esfregaço após coloração de Gram: a observação do Gram é importante, dado que possibilita uma avaliação da presença ou ausência de flora bacteriana (tipo e eventual predomínio), células leveduriformes e “clue cells”. As “clue cells” são células epiteliais de descamação repletas de bacilos de Gram variável, sugestivas de infecção por *G. vaginalis*, quando associadas a ausência ou diminuição de *Lactobacillus* spp. (bacilos grandes Gram-positivo).

b) Exame Cultural

A sementeira do exsudato é efetuada em GS, gelose Chocolate (GC) ou gelose PolyVitek VCAT3 (para a pesquisa de infeções por *Neisseria gonorrhoeae*), gelose Sabouraud com Gentamicina e Cloranfenicol (SGC). As placas são incubadas, a 37°C em aerobiose (GS) e atmosfera de CO₂ (GC). A leitura é efetuada após 24 horas de incubação.

É também utilizado um meio de cultura próprio para a **pesquisa de *Streptococcus agalactiae***.

Este exame bacteriológico é requisitado pelo serviço de obstetrícia e tem especial interesse para detetar a provável colonização da mucosa vaginal/anal por *S. agalactiae*. A presença deste coco gram-positivo durante a gravidez é importante, já que, durante o parto, pode ocorrer transmissão vertical causando pneumonia, septicémia, ou meningite no recém-nascido (29)(38)(39).

O rastreio de *S. agalactiae* é normalmente feito em exsudato vaginal/anal em meio Granada, que é seletivo para identificação de *S. agalactiae* (figura 8).

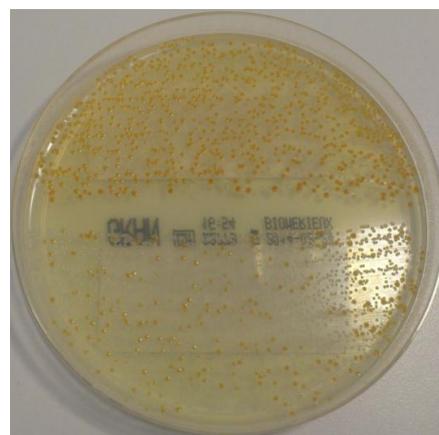


Figura 8: Pesquisa de *Streptococcus agalactiae* em meio Granada. A cultura apresenta colónias de tom laranja indicando a presença de *S. agalactiae*.

2.7.3. Fezes

A deteção dos agentes bacterianos normalmente associados a infeções gastrointestinais é dificultada pela presença da flora normal do trato digestivo, constituída na sua grande maioria, por anaeróbios estritos e apenas uma pequena percentagem de anaeróbios facultativos, como *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Candida albicans*. Deste modo, em condições de aerobiose, grande parte da flora intestinal não cresce, limitando-se às enterobactérias. O exame bacteriológico de fezes é orientado, por rotina (a não ser que haja um pedido específico), para a pesquisa das bactérias dos géneros *Salmonella*, agentes da febre tifóide e de outras salmoneloses (gastroenterites) e *Shigella*, agente da shigelose ou disenteria bacilar (29)(40)(41). Posteriormente, são efetuados exames macroscópicos, diretos, culturais e, se requisitados, exames parasitológicos e alguns testes rápidos:

a) Exame direto

No exame macroscópico observa-se a consistência das fezes (formadas ou líquidas) e a presença de muco ou sangue, que possibilita uma orientação para o diagnóstico do agente etiológico da infecção.

No exame microscópico efetua-se um exame direto a fresco, entre lâmina e lamela, para pesquisa de leucócitos nas fezes.

b) Exame Cultural

O exame bacteriológico de fezes é normalmente orientado para a pesquisa de bactérias dos géneros *Salmonella* e *Shigella*. As fezes são semeadas em gelose Salmonella Shigella (SS) e gelose Chrom ID Salmonella (SM2), dois meios sólidos de isolamento seletivo e de identificação para a deteção de espécies *Salmonella* e *Shigella*. As fezes são também inoculadas em meio de enriquecimento líquido, o caldo selenito, que inibe o crescimento de outras enterobactérias. Os meios de cultura são incubados a 37°C, por 12 a 24h. O caldo selenito é posteriormente repicado para os meios SS e SM2.

As colónias de *Salmonella* sp. e *Shigella* sp. apresentam características específicas em cultura (figura 9).

Caso se suspeite da presença de colónias de alguma destas bactérias, estas devem ser isoladas e identificadas (VITEK 2 Compact) e seguidamente a confirmação do género e da espécie por testes serológicos.

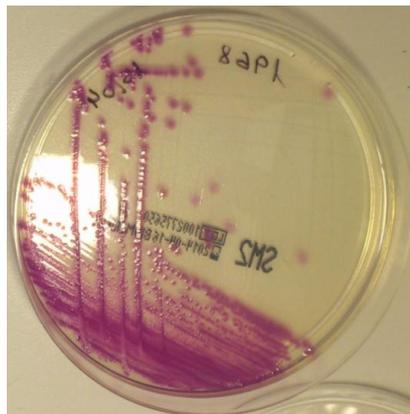


Figura 9: Coprocultura em meio SM2. As colónias lilás são sugestivas da presença de *Salmonella* sp.

c) Exame parasitológico de fezes

Quando requisitado este exame o procedimento para a colheita de fezes deverá ser de três amostras em dias não consecutivos, tendo em conta a eliminação intermitente de certos parasitas. As amostras devem ser colhidas em contentor apropriado e quando recebidas no laboratório são submetidas a:

- exame macroscópico: observa-se se existe a presença de muco, sangue ou elementos parasitários (vermes adultos ou fragmentos dos mesmos);

- exame microscópico: realiza-se após um método de concentração, que baseia-se no princípio de sedimentação. Este método usa uma solução que funciona como meio de conservação, um solvente de lípidos, o acetato de etílio e um filtro que retém as partículas de maiores dimensões. Após centrifugação, obtém-se um sedimento mais limpo com os elementos parasitários, caso os haja, em maior concentração, livre de todos os resíduos lipofílicos. Para melhorar a observação usa-se o lugol como corante.

d) Pesquisa do antígeno e das Toxinas A e B de *Clostridium difficile*

A flora bacteriana normal do intestino constitui uma barreira natural contra o desenvolvimento de organismos patogênicos. *Clostridium difficile* é um dos agentes etiológicos mais associados a diarreias nosocomiais. O uso de antibioterapia leva a uma redução da flora endógena intestinal e conseqüentemente à proliferação de microrganismos patogênicos endógenos, ou contaminação exógena, como *C. difficile*. As estirpes toxigênicas produzem uma enterotoxina, a toxina A e uma citotoxina, a toxina B, que conduzem a uma colite pseudomembranosa. Ambas toxinas são bons marcadores da presença desta bactéria (29)(42)(43). Para detetar a sua presença em amostras de fezes, o laboratório usa um teste imunocromatográfico que utiliza anticorpos monoclonais específicos para o antígeno e para as toxinas A e B do *C. difficile*.

e) Pesquisa do antígeno de *Helicobacter pylori*

O pH ácido do estômago constitui uma importante barreira de defesa do sistema gastrointestinal. A bactéria *Helicobacter pylori* apresenta uma ótima relação adaptativa ao nível do estômago, podendo colonizar a mucosa gástrica, já que consegue escapar à ação do suco gástrico, devido à produção de urease, que neutraliza parcialmente o ambiente ácido do estômago. Desta forma, pode proliferar e constituir um dos principais agentes etiológicos responsáveis por úlceras pépticas, gastrites crônicas e associado frequentemente a câncer do estômago (29)(44)(45). Para detetar a sua presença, faz-se a pesquisa do seu antígeno em amostras de fezes, com recurso a um teste imunocromatográfico.

f) Pesquisa de *Campylobacter* sp.

Campylobacter sp. é um dos agentes etiológicos de gastroenterites da comunidade, associado à ingestão de alimentos (carnes de aves mal cozinhadas) ou águas contaminadas ou por manipulação de animais contaminados. Esta bactéria está frequentemente relacionada com infecções gastrointestinais infantis (29)(46)(47). Para detetar a sua presença em amostras de fezes, o laboratório tem ao seu dispor um teste imunocromatográfico (teste qualitativo) e um meio sólido seletivo e de identificação para *Campylobacter* sp., a gelose “Charcoal-Cefoperazone-Deoxycholate Agar” (CCDA) (figura 10). O meio é incubado a 37°C, em atmosfera de microaerofilia, durante 48h. Se houver desenvolvimento bacteriano, com colónias sugestivas de *Campylobacter* sp., procede-se à identificação da espécie.

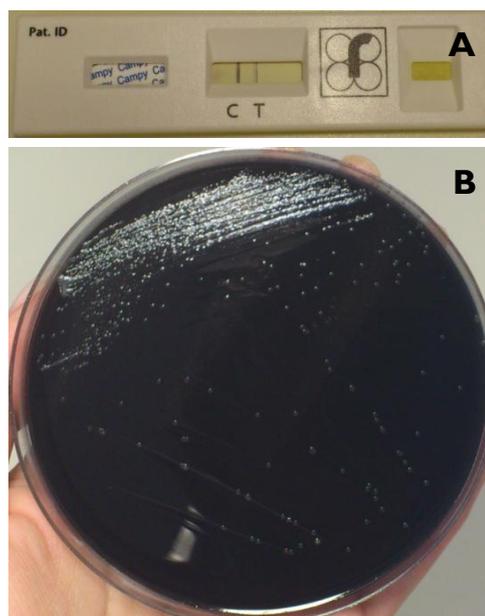


Figura 10: Diagnóstico laboratorial de *Campylobacter* sp. A: Teste imunocromatográfico positivo para *Campylobacter* sp. B: Cultura em meio CCDA apresentando colónias características de *Campylobacter* sp.

g) Pesquisa de Adenovírus e Rotavírus

Muitas gastroenterites apresentam origem viral sendo os agentes etiológicos mais comuns, os vírus Adenovírus e Rotavírus. Estes agentes estão frequentemente associados a gastroenterites virais em crianças (48)(49). O laboratório dispõe de um teste imunocromatográfico para a deteção destes dois vírus em amostras fecais.

2.7.4. Expetoração e outras amostras respiratórias

O tratamento das amostras provenientes do trato respiratório inferior (expetoração, aspirados/lavados brônquicos), que chegam ao laboratório para exame bacteriológico, compreende um exame direto e um exame cultural:

a) Exame direto

No exame direto são realizados esfregaços para coloração de Gram e/ou para coloração de Ziehl-Neelsen, dependendo do pedido. A observação do Gram permite avaliar a qualidade da amostra, tendo em conta a presença de leucócitos, células epiteliais e o predomínio de alguma espécie bacteriana.

b) Exame cultural bacteriológico

Geralmente as amostras são semeadas em meio GS e GC, incubadas a 37°C, durante 24h (a GC incubada em atmosfera rica em CO₂). As espécies que se desenvolvem nos meios de cultura são valorizadas tendo em atenção o exame microscópico do Gram.

As identificações e antibiograma são feitos no VITEK 2 Compact ou em galerias API/ATB seguindo a metodologia para identificações e antibiogramas.

Pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis*

As infeções por micobactérias constituem uma enorme preocupação de saúde pública a nível mundial. A micobactéria patogénica *Mycobacterium tuberculosis* é o agente etiológico da tuberculose pulmonar (29). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que, em 2012, aproximadamente 8,6 milhões de pessoas desenvolveram tuberculose e 1,3 milhões de pessoas morreram devido à doença (50).

O tratamento das amostras do trato respiratório para diagnóstico laboratorial de micobactérias compreende um exame direto e cultural:

a) Exame direto

Para a pesquisa de micobactérias neste tipo de amostras, faz-se um esfregaço que é corado pela técnica de Ziehl-Neelsen de forma a observar a presença de BAAR (figura 11).

b) Exame cultural

As culturas são mais sensíveis do que os exames diretos e são necessárias para a identificação da espécie de micobactéria. Estas amostras são submetidas a um processo de homogeneização e descontaminação e de seguida é realizado o exame cultural. A cultura é efetuada em meio sólido (meio de Lowenstein-Jensen) e em meio líquido (frascos do sistema Bact/Alert 3D). O meio Lowenstein-Jensen é um meio seletivo, enriquecido com a presença de ovo, de asparagina e de fécula, que favorece o crescimento das micobactérias. O meio é incubado em estufa a 37°C, em atmosfera de aerobiose. Na ausência de crescimento em cultura o resultado é reportado como negativo ao fim de 60 dias de incubação.

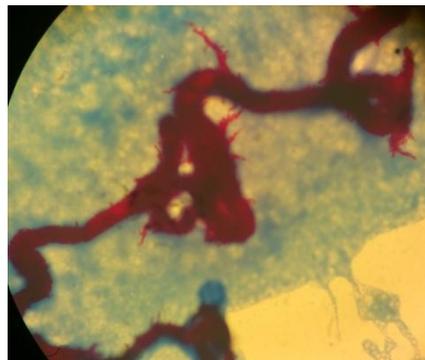


Figura 11: Observação microscópica de BAAR em cordão corados pela técnica Ziehl-Neelsen.

Os frascos do sistema Bact/Alert 3D contêm um meio líquido de cultura, desenvolvido para um melhor crescimento das micobactérias. Os frascos são colocados no sistema Bact/Alert 3D onde são incubados a 37°C e monitorizados continuamente durante 42 dias. Se durante este período de tempo houver crescimento bacteriano, o equipamento deteta um aumento de fluorescência, e emite um sinal luminoso correspondente ao “frasco positivo”.

Em caso de positividade, procede-se a uma observação de BAAR através de uma coloração de Ziehl-Neelsen. É igualmente realizada uma cultura do meio líquido em GS para averiguação de contaminação. Se esta estiver contaminada a amostra deverá ser novamente descontaminada e incubada. No caso de confirmação microscópica da existência de BAAR, a cultura em meio sólido ou líquido é enviada para o INSA para identificação e testes de sensibilidade aos antituberculostáticos.

2.7.5. Exsudatos Purulentos

Ao laboratório podem chegar colheitas de pus, em zaragatoa ou seringas de aspiração de diversas partes do corpo. É realizado um exame direto e cultural:

a) Exame direto

Faz-se a observação microscópica do esfregaço após coloração de Gram para avaliação da presença de leucócitos, células epiteliais e da flora bacteriana existente.

b) Exame cultural

A sementeira é realizada em GS e a incubação é feita a 37°C, em aerobiose e/ou anaerobiose, dependendo do tipo de estudo pretendido.

Durante a observação das sementeiras, a valorização das colónias isoladas depende da zona anatómica da qual foi colhido o produto, a história clínica do doente e o que foi observado no Gram.

As identificações e antibiogramas são feitos no VITEK 2 Compact ou em galerias API/ATB seguindo a metodologia para identificações e antibiogramas.

2.7.6. Sangue

A presença de bactérias na corrente sanguínea (bacteriémia) é detetado através de hemoculturas. Para tal, as amostras de sangue extraídas por punção venosa são introduzidas diretamente para frascos de hemocultura (frascos em aerobiose e anaerobiose Bact/Alert 3D) que são incubados depois no sistema Bact/Alert 3D (29). Este sistema permite a incubação, agitação e monitorização contínua das hemoculturas em meios aeróbios e anaeróbios, inoculados com amostras de sangue, realizando leituras periódicas para a deteção de positividade microbiana. O meio de cultura dos frascos fornece as condições nutricionais e ambientais adequadas ao desenvolvimento dos microrganismos associados a infeções sanguíneas. Para detetar o crescimento bacteriano, o Bact/Alert 3D usa um sensor colorimétrico e a reflexão de luz para monitorizar a presença e a produção de CO₂ dissolvido no meio de cultura. A presença de bacteriémia na amostra inoculada conduz à produção de CO₂, uma vez que há metabolização dos substratos existentes no meio de cultura.

As culturas, regra geral, permanecem no equipamento até completarem sete dias de incubação caso não haja qualquer sinal de positividade, desta forma a hemocultura é considerada negativa. Contudo, para microrganismos fastidiosos consideram-se vinte dias de incubação. Sempre que uma amostra é positiva, realiza-se:

a) Exame direto

Faz-se um esfregaço que é corado pela coloração de Gram.

b) Exame cultural

As hemoculturas positivas são geralmente semeadas em GS, e incubadas a 37°C e em atmosferas de aerobiose e anaerobiose.

As identificações e antibiogramas são feitos no VITEK 2 Compact ou em galerias API/ATB seguindo a metodologia para identificações e antibiogramas.

2.7.7. Líquido Cefalorraquídeo

A punção lombar para colheita de LCR é realizada por profissionais médicos especializados. A colheita deve ser realizada em recipientes estéreis, adequadamente vedados e transportados de imediato para o laboratório de forma a não comprometer o diagnóstico laboratorial (29). O LCR é submetido a um exame direto (contagem citológica e Gram) e um exame cultural:

a) Exame direto:

Após receção do LCR, é feito de imediato um exame macroscópico (aspecto e coloração). Posteriormente, procede-se à observação microscópica a fresco do LCR, em câmara de *Fuchs-Rosenthal*, para contagem dos elementos celulares (leucócitos e eritrócitos). No caso de ser requisitado a pesquisa de *Cryptococcus neoformans*, é efetuada uma observação microscópica a fresco, com tinta-da-china de forma a evidenciar a cápsula deste fungo. Realiza-se, também, uma observação de esfregaços corados pela técnica de Gram.

b) Exame cultural:

As amostras de LCR são semeadas por picada em GS e GC e incubadas a 37°C, durante 24 horas, em aerobiose e atmosfera de CO₂. A observação das placas é feita durante cinco dias consecutivos.

As identificações e antibiogramas são feitos no VITEK 2 Compact seguindo a metodologia para identificações e antibiogramas.

2.7.8. Pele, Cabelos e Fragmentos de Unhas

As micoses humanas superficiais podem afetar a pele, o cabelo e as unhas e compreendem geralmente as dermatomicoses (associadas a fungos dermatófitos) e as candidíases cutâneas (associadas a *Candida* spp). Os dermatófitos mais associados ao parasitismo do homem e consequente infecção cutânea pertencem aos géneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. O agente etiológico mais prevalente em candidíases cutâneas é *Candida albicans* (51)(52). No laboratório, sempre que requisitado exame micológico de escamas de pele ou cabelo e de fragmentos de unhas procede-se a um exame direto e cultural:

a) Exame direto:

As amostras de raspados de pele, cabelos e unhas que chegam ao laboratório são sujeitas a um exame microscópico direto, usando hidróxido de potássio (KOH) a 20% para a dissolução da queratina existente nas amostras e facilitar a visualização dos elementos fúngicos (26).

b) Exame cultural:

As amostras são semeadas em meio SGC e em lâmina gelosada Mycoline [dois meios: SGC e gelose Sabouraud Cloranfenicol Actidiona (SCA)], incubadas a 25°C e examinadas uma vez por semana, durante 3 semanas. O meio SGC é seletivo para cultura de leveduras e fungos filamentosos em amostras que estejam normalmente contaminadas com flora saprófita, já que a presença dos dois antibióticos inibe o crescimento da maioria das bactérias Gram-positivo e negativo que possam estar na amostra.

Na avaliação da sementeira, se existir crescimento de colónias de fungos o procedimento seguinte depende do fungo isolado:

- Fungos leveduriformes: efetua-se um teste em látex sobre lâmina, específico para identificação de *Candida albicans*. Se o teste for negativo, a identificação deve ser executada no VITEK 2 Compact;
- Fungos filamentosos: observa-se a morfologia macroscópica da colónia, tendo em atenção a cor da colónia (frente e verso), a forma da colónia, a textura da superfície e o tempo de crescimento (figura 12). Efetua-se de seguida um exame a fresco para observação da morfologia microscópica, sendo de realçar o tipo de conídeos

(macroconídeos ou microconídeos), o seu número e padrão de agrupamento; e o tipo de hifas (septadas ou asseptadas) e o modo como se ramificam.

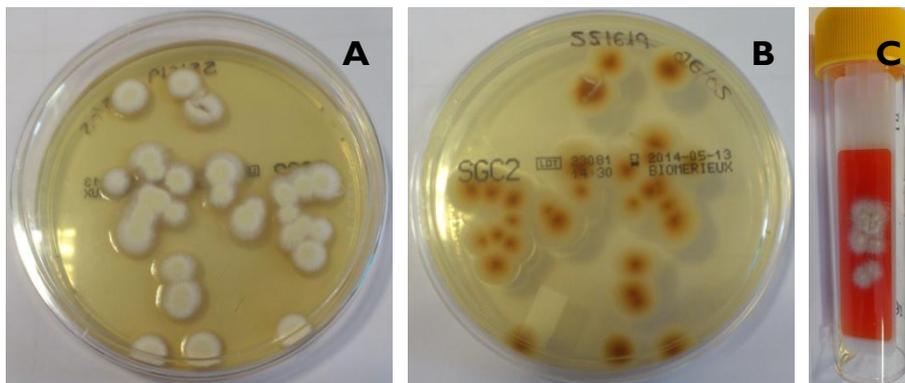


Figura 12: Cultura em SGC e em lâmina gelosada Mycoline, evidenciando o crescimento de um fungo filamentoso. A: Frente da colônia em SGC; B: Verso da colônia em SGC; C: Colônias do fungo filamentoso, em meio SCA, em lâmina gelosada Mycoline.

2.8. Identificações e Antibiogramas

Os microrganismos são identificados pelas suas várias características, peculiarmente pelas características morfológicas, culturais, bioquímicas e antigénicas. No sector de Microbiologia, o procedimento para identificações e antibiogramas é definido a partir da avaliação do exame cultural e dos respetivos exames diretos (a fresco e/ou após coloração). Neste sector, a identificação dos microrganismos e sua suscetibilidade aos antibióticos, é realizada no equipamento automatizado VITEK 2 Compact. Para este procedimento, é utilizada uma suspensão microbiana pura (segundo escala de “MacFarland”).

Todavia, se necessário recorre-se a algumas provas manuais complementares para auxiliar o processo de identificação do microrganismo:

a) Prova da catalase

Teste usado para verificar a presença da enzima catalase em colónias morfológicamente sugestivas de cocos Gram-positivo, permitindo a sua diferenciação (29):

- a) Catalase (+): *Staphylococcus* sp.
- b) Catalase (-): *Streptococcus* sp. ou *Enterococcus* sp.

No caso da prova da catalase ser positiva é realizada a **prova da coagulase**, um teste rápido por aglutinação em látex para identificação de *Staphylococcus aureus* (29). Num teste

positivo pode observar-se uma aglutinação visível a olho nu, indicando a presença de colónias de *S. aureus*.

b) Prova da Optoquina

Recorre-se a esta prova quando em cultura, aparecem colónias sugestivas de *Streptococcus pneumoniae*. Esta bactéria é normalmente sensível à optoquina. A existência de um halo de inibição à volta de um disco de optoquina na superfície de uma placa semeada com colónias suspeitas é sugestiva da presença de *S. pneumoniae* (figura 13). Esta prova, é um teste presuntivo e depende da sensibilidade à optoquina das espécies testadas (53).



Figura 13: Prova da optoquina em cultura presuntiva de *S. pneumoniae*, em GS. A presença do halo de inibição confirma a presença de *S. pneumoniae*.

c) Prova da Bacitracina

Teste que permite fazer a identificação de colónias sugestivas de estreptococos do grupo A que apresentam β -hemólise (*Streptococcus pyogenes*) (54). A presença de um halo de inibição à volta de um disco de bacitracina na superfície de uma placa semeada com colónias suspeitas é indicativo de eventual presença de *S. pyogenes*.

d) Prova da Oxidase

A enzima citocromo oxidase, produzida por alguns microrganismos, incluindo espécies de *Neisseria* e *Pseudomonas*, atua na cadeia respiratória e catalisa a oxidação do citocromo C pelo oxigénio molecular, que funciona como recetor terminal de eletrões (29). O teste efetuado no sector utiliza discos impregnados com reagente que muda de cor quando exposto à enzima citocromo oxidase. Numa reação positiva há mudança de cor para azul-púrpura.

Todas as identificações, realizadas por provas manuais, são confirmadas no VITEK 2 Compact e o antibiograma será efetuado com as respetivas cartas. Os resultados emitidos pelo equipamento são cuidadosamente avaliados pelo Técnico Superior de Saúde deste sector, de forma a verificar incoerências e para definir quais os antibióticos a serem reportados, tendo em conta a informação clínica, as resistências naturais de alguns microrganismos e a realidade do hospital.

CONCLUSÃO

O Mestrado em Análises Clínicas correspondeu às minhas intenções iniciais de enriquecer os meus conhecimentos teóricos na área da saúde e nas técnicas laboratoriais aplicadas à mesma. O estágio foi gratificante na medida em que pude trabalhar em contexto real, deparando-me com a rotina e atividade de um laboratório inserido em ambiente hospitalar. Desta forma, e com o apoio de pessoal especializado, adquiri competências fundamentais para o meu percurso curricular e para o meu futuro profissional. Em suma, o Mestrado em Análises Clínicas com a inclusão do estágio, não só contribuiriam para a minha formação académica, como também para a minha formação pessoal, dando-me a oportunidade de experienciar uma rotina profissionalizante e o convívio e interação com vários profissionais de saúde que me transmitiram o seu saber e experiência.

BIBLIOGRAFIA

1. BANFI G., SALVAGNO G. L., LIPPI G. – *The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes*. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. (2007) 45(5):565-76.
2. UPRETI, S. *et al* – *Types and Frequency of Preanalytical Errors in Haematology Lab*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. (2013) 7(11):2491-2493.
3. HAWKINS, R. – *Managing the Pre- and Post-analytical Phases of the Total Testing Process*. *Annals of Laboratory Medicine*. (2012) 32:5-16.
4. PLEBANI, M. *et al* – *Harmonization of pre-analytical quality indicators*. *Biochimica Medica*. (2013) 24(1):105-13.
5. AZEVEDO, A. P. – *Valores de referência para hemograma na população da Zona Metropolitana de Lisboa*. *Acta Med Port*. (2010) 23(4):597-604.
6. HOFFBRAND, A. V., PETTIT, J. E. – *Color Atlas of Clinical Hematology*. 3ª ed. London: Mosby, 2000. ISBN: 07234 31159.
7. HOFFBRAND, A. V., MOSS, P. A. H. – *Fundamentos em Hematologia*. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. ISBN: 978-85-65852-30-2.
8. AROSA, F. A., CARDOSO, E. M., PACHECO, F. C. – *Fundamentos de Imunologia*. 1ªed. Lisboa: Lidel, 2007. ISBN: 978-972-757-396-7.
9. LIU, Z., PETERSEN, R., DEVIREDDY, L. – *Impaired neutrophil function in 24p3 null mice contributes to enhanced susceptibility to bacterial infections*. *J Immunol*. (2013) 190(9):4692-4706.
10. FITZSIMMONS, C. M., FALCONE, F. H., DUNNE, D. W. – *Helminth allergens, parasite-specific IgE, and its protective role in human immunity*. *Front. Immunol*. (2014) 5(61).
11. SERRANO-VILLAR, S. *et al* – *Neutropenia During Therapy With Peginterferon and Ribavirin in HIV-Infected Subjects With Chronic Hepatitis C and the Risk of Infections* *Clinical Infectious Diseases*. *HIV/AIDS*. (2013) 57(3):458-64.
12. DE RYCHE, A., DIERICKX, D., KUYPERS, D. R. – *Tacrolimus-Induced Neutropenia in Renal Transplant Recipients*. *Clin J Am Soc Nephrol*. (2011) 6:690-694.

13. GAUER, R. L., BRAUN, M. M. – *Thrombocytopenia*. *American Family Physician*. (2012) 85(6):612-622.
14. DUSSE, L. M. S., VIEIRA, L. M., CARVALHO, M. G. – *Pseudotrombocitopenia*. *Jornal Brasileiro de Medicina e Patologia Laboratorial*, (2004) 40(5):321-324.
15. CHIA, J., HSIA, C. C. – *Pseudothrombocytopenia*. *London Health Sciences Centre. BLOOD*, (2011) 117(16):4168.
16. PINTO, A. M. – *Fisiopatologia: Fundamentos e Aplicações*. 1ª ed. Lisboa: Lidel, 2009. ISBN: 978-972-757-429-2.
17. NUNES, L. A. S. et al – *Hematological and Biochemical Markers of Iron Status in a Male, Young, Physically Active Population*. *BioMed Research International*. (2014):349182.
18. JOANNY, F. et al – *Limit of blank and limit of detection of Plasmodium falciparum thick blood smear microscopy in a routine setting in Central Africa*. *Malaria Journal*. (2014) 13:234.
19. GUAGNOZZI, D., LUCENDO, A. J. – *Anemia in inflammatory bowel disease: a neglected issue with relevant effects*. *World J Gastroenterol*. (2014) 20(13):3542-3551.
20. BEVILACQUA, J. L., CANZIANI, M. E. F. – *Monitorização dos parâmetros hematimétricos*. *J Bras Nefrol*. (2014) 36(1):13-14.
21. GALANELLO, R. – *Prevention of Thalassaemias and Other Haemoglobin Disorders*. 2nd ed. Vol. 1. Nicosia, Cyprus: Thalassaemia International Federation, 2013. ISBN-10: 9963-623-39-5. [Acedido a 25 de Agosto de 2014]. Disponível na internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190481/>.
22. GIORDANO, P. C., CORNELIS, L. – *Genetic Epidemiology and Preventive Healthcare in Multiethnic Societies: The Hemoglobinopathies*. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. (2014) 11:6136-6146.
23. CDC – *Malaria*. Centers for Disease Control and Prevention, 2012. [Acedido a 11 de Agosto de 2014]. Disponível na internet: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>.
24. WHO – *Malaria*. World Health Organization, 2014. [Acedido a 11 de Agosto de 2014]. Disponível na internet: <http://www.who.int/topics/malaria/en/>.

25. DZAKAH, E. E. *et al* – *Comparative performance of aldolase and lactate dehydrogenase rapid diagnostic tests in Plasmodium vivax detection*. Malaria Journal. (2014) 13:272.
26. BRUST, M. *et al* – *The plasma protein fibrinogen stabilizes clusters of red blood cells in microcapillary flows*. Scientific Reports. (2014) 4:4348.
27. INGERSLEV, J. *et al* – *New approaches in the measurement of coagulation*. Haemophilia. (2008) 14(3):104-112.
28. CASTAMAN, G. *et al* – *von Willebrand's disease in the year 2003: towards the complete identification of gene defects for correct diagnosis and treatment*. Haematologica/journal of hematology. (2003) 88(1):94-108.
29. BARROSO, H., MELIÇO-SILVESTRE, A., TAVEIRA, N. – *Microbiologia Médica*. 1ª ed. Lisboa: Lidel, 2014. ISBN:978-989-752-057-0.
30. TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. – *Microbiologia*. 10ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. ISBN:978-85-363-2698-6.
31. ASPEVALL, O. *et al* – *Performance of Four Chromogenic Urine Culture Media after One or Two Days of Incubation Compared with Reference Media*. Journal Of Clinical Microbiology. (2002) 40(4):1500-1503.
32. LÓPEZ-BANDA, D. A. *et al* – *Identification of Virulence Factors Genes in Escherichia coli Isolates from Women with Urinary Tract Infection in Mexico*. BioMed Research International. (2014):959206.
33. ECHEVERRI, C. V. *et al* – *Resistance profile for pathogens causing urinary tract infection in a pediatric population, and antibiotic treatment response, at a University Hospital 2010-2011*. Colombia Médica. (2014) 45(1):39-44.
34. PIERETTI, B. *et al* – *Diagnosis of Bacteriuria and Leukocyturia by Automated Flow Cytometry Compared with Urine Culture*. Journal Of Clinical Microbiology. (2010) 48(11): 3390-3996.
35. POLONI, J. A. T. *et al* – *Urinary Red Blood Cells: Not Only Glomerular or Nonglomerular*. Nephron Clin Pract. (2012) 120:36-41.

36. HUIJSEN, J., KOENE, R. A. P., HILBRANDS, L. B. – *The (fixed) urinary sediment, a simple and useful diagnostic tool in patients with haematuria*. The Netherlands Journal of Medicine. (2004) 62(1).
37. MOTA, A. et al – *Avaliação de métodos microscópicos para diagnóstico de vaginose bacteriana*. Acta Médica Portuguesa. (2000) 13:77-80.
38. FIOLO, K. et al – *Taxa de infecção e sorotipos de Streptococcus agalactiae em amostras de recém-nascidos infectados na cidade de Campinas (SP), Brasil*. Rev Bras Ginecol Obstet. (2012) 34(12):544-9.
39. MARCONI, C. et al – *Detection of Streptococcus agalactiae colonization in pregnant women by using combined swab cultures: cross-sectional prevalence study*. Sao Paulo Med J. (2010) 128(2):60-2.
40. CDC – *Salmonella*. Centers for Disease Control and Prevention, 2012. [Acedido a 30 de Julho de 2014]. Disponível na internet: <http://www.cdc.gov/salmonella/general/index.html>.
41. CDC – *Shigellosis*. Centers for Disease Control and Prevention, 2013. [Acedido a 30 de Julho de 2014]. Disponível na internet: <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/shigellosis/>.
42. ALFA, M., SEPEHRI, S. – *Combination of culture, antigen and toxin detection, and cytotoxin neutralization assay for optimal Clostridium difficile diagnostic testing*. Can J Infect Dis Med Microbiol. (2013) 24(2):89-92.
43. SPADÃO, F. et al – *Incidence of diarrhea by Clostridium difficile in hematologic patients and hematopoietic Stem Cell Transplantation patients: risks factors for severe forms and death*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. (2014) 56(4):325-331.
44. LOPES, M., ALVES, S., BARREIRA, R. – *Relação entre os grupos sanguíneos ABH e Lewis e infeção por h. pylori em doentes com patologia gástrica*. In: Ciência, Saúde e Inovação: Investigação aplicada em Análises Clínicas e Saúde Pública. Vol. 4. Coimbra: Escola superior de tecnologia da saúde de Coimbra. (2011) ISBN: 978-989-8252-15-9. p. 17-18.
45. AIHARA, E. et al – *Motility and Chemotaxis Mediate the Preferential Colonization of Gastric Injury Sites by Helicobacter pylori*. PLoS Pathogens. (2014) 10(7):1004275.

46. FONSECA, B. B. *et al* – *Campylobacter jejuni* in commercial eggs. *Brazilian Journal of Microbiology*. (2014) 45(1):76-79.
47. LIÉBANA-MARTOS, M. C. *et al* – *Sensibilidad de tres test inmunocromatográficos para detección de Campylobacter y Salmonella en heces en comparación con el cultivo*. *Rev Esp Quimioter*. (2014) 27(2):102-105.
48. RABONI, S. M. *et al* – *Acute gastroenteritis and enteric viruses in hospitalised children in southern Brazil: aetiology, seasonality and clinical outcomes*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. (2014) 109(4):428-435.
49. KIM, J. *et al* – *Evaluation of an Immunochromatographic Assay for the Rapid and Simultaneous Detection of Rotavirus and Adenovirus in Stool Samples*. *Ann Lab Med*. (2014) 34:216-222.
50. WHO – *Global tuberculosis report 2013*. World Health Organization, 2014. [Acedido em 30 de Julho de 2014]. Disponível na internet: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656_eng.pdf.
51. RODRIGO, F. G.; MAYER-DA-SILVA, A.; ALMEIDA, L. S. – *Infeções e Infestações cutâneas*. 1ª ed. Lisboa: LIDEL, 2007. ISBN: 978-972-757-414-8.
52. GARG, J. *et al* – *Rapid detection of dermatophytes from skin and hair*. *BMC Research Notes*. (2009) 2(60).
53. WESSELS, E. *et al* – *Evaluation of Several Biochemical and Molecular Techniques for Identification of Streptococcus pneumoniae and Streptococcus pseudopneumoniae and Their Detection in Respiratory Samples*. *Journal of Clinical Microbiology*. (2012) 50(4):1171-1177.
54. MORAIS, V. M. S. *et al* – *Prevalence of β -hemolytic Streptococcus in children with special health care needs*. *Braz J Otorhinolaryngol*. (2012) 78(5):110-5.

ANEXOS

Anexo I: Valores de referência (VR) do sector de Hematologia do serviço de Medicina Laboratorial do HDFF, EPE

Parâmetros	VR	Unidades
Hemograma		
Eritrócitos	4,2 – 5,4 (mulheres) 4,7 – 6,0 (homens)	$10^6/\mu\text{L}$
Hemoglobina	12,5 – 16 (mulheres) 13,5 – 18 (homens)	g/dL
Hematócrito	37 – 47 (mulheres) 42 – 52 (homens)	%
VGM	78 – 100	fL
HGM	27 – 31	pg
CHGM	32 – 36	g/dL
RDW	11,5 – 14	%
Leucócitos	4 – 10,5	$10^3/\mu\text{L}$
Neutrófilos	1,5 – 6,6	$10^3/\mu\text{L}$
Linfócitos	1,5 – 3,5	$10^3/\mu\text{L}$
Monócitos	< 1	$10^3/\mu\text{L}$
Eosinófilos	< 0,7	$10^3/\mu\text{L}$
Basófilos	< 0,1	$10^3/\mu\text{L}$
Plaquetas	150 – 450	$10^3/\mu\text{L}$
VPM	6 – 9,5	fL
Coagulação		
Tempo de Protrombina		
TP (doente)	12,5 – 15,8	s
TP (atividade %)	70-100	%
INR	0,9 – 1,0	-
aPTT	25,4 – 36,9	s
Fibrinogénio (funcional)	367 – 437	s

Anexo 2: Software do CELL-DYN Sapphire apresentando um Hemograma com as contagens celulares, cálculo dos índices hematimétricos e a distribuição das células no histograma da contagem.

