



João Nuno Figueiredo Cortez Ferreira

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Dr^a Sílvia Malheiro e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

João Nuno Figueiredo Cortez Ferreira

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Dr^a Sílvia Malheiro
e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Agradecimentos

Neste capítulo quero deixar um agradecimento especial a várias pessoas que sem as quais não era possível terminar uma aventura de dois anos como esta.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus pais e irmão por toda a entrega, carinho e esforço ao longo do mestrado. Todo o meu empenho e luta não seriam válidos sem o vosso apoio.

Gostaria de também de agradecer à minha namorada, Bárbara, pela paciência e compaixão ao longo de vários meses de distância. O teu amor e energia proporcionaram uma entrega adicional para cumprir todos os objetivos.

Agradeço a toda a equipa do Serviço de Patologia Clínica pela experiência de trabalhar em equipa num hospital distrital, no qual ganhei vários conhecimentos, tanto profissionais como pessoais.

Quero também agradecer a colegas e amigos pelas longas horas de conversas que me fizeram acalmar em tempos de muito nervosismo e saudades.

Agradeço à Professora Doutora Ana Matos pela disponibilidade e sinceridade ao longo dos 6 meses de estágio.

Por último gostaria de agradecer à Professora Doutora Leonor Almeida pelos dois anos no Mestrado em Análises Clínicas, o qual foi de acordo com as minhas expectativas.

Índice

Agradecimentos	iii
Figuras e Tabelas.....	ix
Abreviaturas	xi
Resumo	xiii
Abstract.....	xiii
1. Introdução	1
2. Caracterização do Laboratório de Estágio	3
3. Avaliação Externa de Qualidade.....	5
4. Hematologia	6
4.1 Hemograma.....	6
4.2 Metodologias.....	8
4.3 Índices Eritrocitários	10
4.3.1 Hematócrito (HCT)	10
4.3.2 Hemoglobina (HGB)	11
4.3.3 Volume Corpuscular Médio (VCM)	11
4.3.4 Hemoglobina Corpuscular Média (HGM)	11
4.3.5 Concentração da Hemoglobina Globular Média (CHGM).....	11
4.3.6 Red Cell Distribution Width (RDW).....	12
4.4 Gasimetria.....	12
4.5 Velocidade de Sedimentação	14
4.6 Hemoglobina glicada.....	15
4.7 Avaliação morfológica através de um esfregaço sanguíneo periférico.....	16
4.7.1 Avaliação morfológica dos glóbulos vermelhos	17
4.7.2 Avaliação das plaquetas	18
4.7.3 Avaliação dos glóbulos brancos.....	18
4.8 Alterações Patológicas na linhagem eritrocitária	18
4.9 Alterações patológicas nas linhagens mieloide e linfoide.....	21
4.10 Alterações patológicas da linhagem plaquetar	21
4.11 Espermogramas	22
4.11.1 Anomalias registadas na avaliação macroscópica.....	23
4.11.2 Características bioquímicas	24
4.11.3 Avaliação microscópica	24
4.11.4 Motilidade.....	24

4.11.5	Vitalidade	25
4.11.6	Concentração dos espermatozóides.....	25
4.11.7	Morfologia	26
4.11.8	Presença de células imaturas.....	27
4.11.9	Leucócitos	28
5.	Microbiologia	29
5.1	Inoculação em meios de cultura.....	29
5.2	Colheita e Sementeira Primária de Produtos Biológicos.....	34
5.2.1	Urina.....	35
5.2.2	Hemoculturas	37
5.2.3	Líquido Cefalorraquidiano	38
5.2.4	Exsudados purulentos, feridas ou abscessos.....	40
5.2.5	Fezes.....	41
5.2.6	Trato Respiratório Superior	42
5.2.7	Trato Respiratório Inferior	43
5.2.8	Exsudado Cervico Vaginal	44
5.2.9	Pontas de Cateter	45
5.3	Observação Microscópica – Aspeto Morfológico.....	46
5.3.1	Coloração de Gram	46
5.3.2	Auramina	46
5.3.3	Kinyoun.....	47
5.4	Testes Bioquímicos.....	47
5.4.1	Prova da Catalase	47
5.4.2	Prova da Coagulase.....	48
5.4.3	Testes presuntivos de estreptococos.....	48
5.4.4	Teste da Optoquina	48
5.4.5	Identificação do grupo de Lancefield.....	49
5.4.6	Meio Bile-esculina	49
5.4.7	Teste da Oxidase.....	49
5.4.8	Prova dos Factores para identificação de Haemophilus spp.....	50
5.5	Métodos de identificação e susceptibilidade.....	51
5.5.1	VITEK ATB EXPRESSION.....	51
5.5.2	BD PHOENIX 100	52
5.6	Método de suscetibilidade manual	52
5.6.1	Método de Kirby-Bauer	52
5.6.2	Método E-Test	53

5.7	Micobactérias	54
5.8	Micologia	56
5.9	Parasitologia	58
5.10	Testes imunocromatográficos.....	60
6.	Conclusões	64
7.	Bibliografia.....	65
	ANEXOS.....	67

Figuras e Tabelas

Figura 1 - Citograma pelo método RF/DC.....	8
Figura 2 - Exemplo de hemograma validado automaticamente pelo SIS.....	9
Figura 3 - Exemplo de hemograma que apresenta flags pelo SIS.....	10
Figura 4 - Exemplo de resultado de velocidade de sedimentação.....	14
Figura 5 - Exemplo de um resultado do HA-8160 com 8,1% de HbA1c.....	16
Figura 6 - Lâmina com esfregaço sanguíneo periférico corada pela coloração de Wright.....	16
Figura 7 - Avaliação da vitalidade através da coloração de eosina.....	25
Figura 8 - Demonstração de uma câmara de contagem e visualização real de um dos quadrantes da câmara de Neubauer (WHO, 2010).....	26
Figura 9 - Diagrama de um espermatozoide normal (Dreamstime, 2015).....	26
Figura 10 - Exemplo de um espermatozoide normal e de espermatozóides anormais (WHO, 2010).	27
Figura 11 - Diferença entre leucócitos polimorfonucleares e uma espermátide (WHO, 2010).	27
Figura 12 - Tipos de hemólise presentes no meio de cultura gelose de sangue.....	33
Figura 13 - Ovo de Trichuris trichiura (Maza, Pezzlo e Baron, 1997).....	60
Figura 14 - Dispositivo do C. DIFF COMPLETE.....	62
Tabela 1 - Parâmetros analisados pelo GEM 4000 e GEM 3500.....	13
Tabela 2 - Fases de processamento da amostra no HA-8160.....	15
Tabela 3 - Principais alterações nos eritrócitos.....	19
Tabela 4 - Outras causas de Anemia por Deficiência em Ferro.....	19
Tabela 5 - Exemplos de Anemias por destruição de eritrócitos.....	20
Tabela 6 - Causas de deficiência de vitamina B12 e/ou ácido fólico.....	20
Tabela 7 - Alterações e causas patológicas da linhagem mieloide (Hoffbrand e Moss, 2013).	21
Tabela 8 - Alterações e causas patológicas da linhagem linfóide (Hoffbrand e Moss, 2013).	21
Tabela 9 - Alterações patológicas que causam Trombocitopenia (Abbott, 2003).	22
Tabela 10 - Alterações patológicas que causam Trombocitose (Abbott, 2003).....	22
Tabela 11 - Características estudadas num espermograma e valores de referência.....	23
Tabela 12 - Meios de cultura utilizados em cada tipo de amostra.....	35
Tabela 13 - Avaliação quantitativa da amostra de urina em meio CLED.....	36
Tabela 14 - Causas comuns de bacteriemia e funginemia (Vandepitte et al., 2003).	38
Tabela 15 - Exemplos de microrganismos que causam meningite (Vandepitte et al., 2003).	39
Tabela 16 - Infecções mais comuns do trato respiratório inferior (Vandepitte et al., 2003).	44
Tabela 17 - Microrganismos que provocam infecções vaginais (Vandepitte et al., 2003).....	44
Tabela 18 - Teste presuntivo após visualização da hemólise.....	48
Tabela 19 - Diferenciação entre bacilos e cocos Gram negativos a partir do teste de oxidase.....	50
Tabela 20 - Interpretação dos resultados na indentificação de Haemophilus spp. através de fatores de crescimento.....	50
Tabela 21 - Cartas de Identificação.....	51
Tabela 22 - Cartas de Sensibilidade.....	52
Tabela 23 - Estruturas possíveis de observar em esfregaço sanguíneo periférico com coloração Wright (Maza, Pezzlo e Baron, 1997).....	59

Abreviaturas

AEQ – Avaliação Externa de Qualidade

APCER – Associação Portuguesa de Certificação

BHI – Brain Heart Infusion

Ca²⁺ – íão Cálcio

CHGM – Concentração da Hemoglobina Globular Média

CIN – Gelose Yersinia

Cl⁻ – íão Cloreto

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI – Concentração Mínima Inibitória

COHb – Carboxihemoglobina

COS – Gelose de Sangue Columbia

ADN – Ácido desoxirribonucleico

EQL – Eletroquimioluminescência

FSC – Forward Scatter Light

G6PD – Glicose-6-fosfato-desidrogenase

HbA_{1c} – Hemoglobina glicada

HBV – Vírus da Hepatite B

HCO₃ – Bicarbonato

HCT – Hematócrito

HCV – Vírus da Hepatite C

HGB – Hemoglobina

HGM – Hemoglobina Corpuscular Média

HHB – Desoxi-hemoglobina

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HKT – Gelose Hektoen

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

iQM – Intelligent Quality Management

K⁺ – íão Potássio

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

LES – Lúpus Eritematoso Sistémico

LMC – Leucemia Mieloide Crónica

MCDT – Meios Complementares de Diagnóstico e Terapêutica

MCK – Gelose MacConkey

MetHb – Met-hemoglobina

Na⁺ – ião Sódio

NaCl – Cloreto de Sódio

O₂Hb – Oxi-hemoglobina

PBS – Tampão de fosfato salino

pCO₂ – Pressão parcial de dióxido de carbono

PCR – Polymerase Chain Reaction

pO₂ – Pressão parcial de oxigénio

PVX – Gelose Chocolate Polivitex

ARN – Ácido Ribonucleico

RSV – Virus Sincicial Respiratório

SGC – Gelose Sabouraud com Gentamicina e Cloranfenicol

SIS – Sysmex Information System

SPC – Serviço de Patologia Clínica

SSC – Side Scatter Light

tHb – Hemoglobina total

ULSAM – Unidade Local de Saúde do Alto Minho

VCM – Volume Corpuscular Médio

VS – Velocidade de Sedimentação

Resumo

Este relatório de estágio curricular, realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, tem como objetivo descrever a minha passagem pelo Serviço de Patologia na Unidade Local de Saúde do Alto Minho (ULSAM) no Hospital de Santa Luzia de Viana do Castelo.

Desta forma, pretendo demonstrar a minha presença na atividade laboratorial diária nos setores que passei ao longo do estágio, destacando o procedimento, métodos e parâmetros analíticos e interpretação clínica dos resultados obtidos.

Decidi explorar mais aprofundadamente os conhecimentos que adquiri nos setores de Hematologia e Microbiologia, destacando-as pelo interesse pessoal nas duas áreas nunca deixando de dar valor às restantes.

Abstract

This internship report, carried out within the Masters in Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy of University of Coimbra, aims to describe my time in the Pathology Department at the Local Unit of the Alto Minho Health (ULSAM) in the Santa Luzia Hospital of Viana do Castelo.

Thus, I mean to demonstrate my participation in daily laboratory activity in the services I cruised along the internship, highlighting the procedures, methods and analytical parameters and clinical interpretation of the results.

Also, I have decided to further unveil the knowledge I acquired in Hematology and Microbiology services, highlighting them by self-interest in both areas never failing to give value to the other.

I. Introdução

O estágio curricular, ao qual o presente relatório se refere, teve como objetivo aperfeiçoar as componentes teóricas e práticas lecionadas ao longo dos dois anos letivos do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Como tal, foi desenvolvido no âmbito de uma rotina laboratorial praticada por profissionais de saúde que, solicitamente, demonstraram disponibilidade em transmitir o seu próprio conhecimento.

Este estágio decorreu na ULSAM, Hospital de Santa Luzia em Viana do Castelo, no Serviço de Patologia Clínica e no Serviço de Imunohemoterapia.

O Serviço de Patologia Clínica engloba três setores: Hematologia, Microbiologia e Imunoquímica. Por sua vez, o Serviço de Imunohemoterapia está estruturado da seguinte forma:

- Banco de Sangue e Centro de Medicina Transfusional, constituído por:
 - Sector de Dádiva de Sangue (Consulta Médica e sector de Enfermagem).
 - Centro de Medicina Transfusional (Laboratório de Imunohematologia, Sector de Processamento e Hemoterapia Clínica).
 - Centro de Trombose e Hemostase (Consultas Externas, Laboratório de Trombose e Hemostase).
 - Laboratório de Biologia Molecular.

Os dois serviços são auxiliados por administrativos que recebem e registam a entrada das amostras de acordo com as análises indicadas pelos médicos.

Isto permite que o tempo de espera seja reduzido e a amostra seja entregue a cada setor atempadamente, permitindo realizar as análises necessárias no menor tempo possível.

Os serviços dispõem de um sistema informático de gestão laboratorial, Clinidata XXI, que estabelece a ligação entre os vários aparelhos automatizados de diagnóstico, oferecendo ao Técnico de Saúde uma base de dados que engloba os dados do doente, todos os resultados das análises realizadas e validação.

O laboratório apresenta diversos sistemas automatizados que, diariamente, são calibrados e avaliados com controlos de qualidade internos que asseguram a qualidade dos resultados

obtidos para as amostras. Mensalmente, a avaliação externa de qualidade permite avaliar o desempenho interlaboratorial com o objetivo de obter resultados credíveis.

Pretende-se, neste relatório de estágio, apresentar toda a prática laboratorial e relacioná-la com as bases teóricas que o mestrado forneceu, avaliando todos os equipamentos utilizados e todas as técnicas realizadas.

2. Caracterização do Laboratório de Estágio

A ULSAM-Hospital de Santa Luzia, situa-se no centro da cidade de Viana do Castelo e constitui uma entidade pública empresarial integrada no Serviço Nacional de Saúde, tendo como objetivo, o acesso à prestação de cuidados de saúde de qualidade, com eficiência e eficácia asseguráveis a toda a população.

O Serviço de Patologia Clínica do HSL (SPC) está integrado no Departamento de Meios Complementares de Diagnóstico e Terapêutica (MCDT) e tem como objetivo o apoio laboratorial a todos os Serviços Clínicos da ULSAM.

O Serviço de Patologia Clínica é dirigido pelo Dr. Mota Freitas, responsável máximo pelo serviço, que intervém tanto em aspetos clínicos e casos de diagnósticos dúbios, como em questões logísticas, bem como a própria estruturação e organização do Serviço de Patologia.

O Sistema de Gestão da Qualidade do Serviço de Patologia Clínica encontra-se certificado de acordo com a NP EN ISSO 9001:2008, pela APCER.

No Serviço de Imunoquímica são realizados vários testes imunológicos e bioquímicos. Após receção das amostras, o Técnico de saúde insere-as no aparelho TECAN, o qual centrifuga e alíquota as amostras de acordo com a configuração pré-determinada. Torna assim possível uma triagem facilitada possibilitando uma gestão de tempo mais adequada.

Na bioquímica utiliza-se o aparelho ARCHITECT, um equipamento automatizado que faz a medição de analitos, sequências de reação e de temporização, utilizando métodos de fotometria, potenciometria e quimioluminescência.

Em Imunologia são utilizados vários equipamentos, como o MiniCAP, que realiza electroforese por capilariedade, o ImunoCAP, que faz o estudo de alergias pelo método FEIA, o Mago 4 que analisa parâmetros de doenças autoimunes ou alergénios através dos métodos de ELISA e IFA. Por último, o aparelho HITACHI Cobas 411 realiza imuno-ensaios, utilizando a electroquimioluminescência (EQL).

O Serviço de Imunohemoterapia é dirigido pelo Dr. Miguel Jorroto e encontra-se autorizado pelo certificado SS 2010.003.

No Serviço de Imunohemoterapia, o Centro de Medicina Transfusional (Laboratório de Imunohematologia; Setor de Processamento), a nível laboratorial, assegura o processamento, estudo analítico e armazenamento do sangue e seus componentes com intervenção médica,

de enfermagem e técnica. É responsável pelo estudo de potenciais recetores, pela preparação e envio do componente mais adequado, de modo eficaz, seguro e racional.

No Laboratório de Trombose e Hemostase são efetuados exames analíticos para despiste e diagnóstico de coagulopatias, estados pró-trombóticos e patologia plaquetária, a doentes do internamento, consulta externa e serviço de urgência. Também é efetuado o controlo de terapêutica anticoagulante e fibrinolítica.

No Laboratório de Biologia Molecular, são efetuados exames analíticos a doentes da ULSAM, relacionados com a área de virologia. Recorre-se assim a técnicas de PCR para deteção de vírus como HIV, HCV e HBV.

Relativamente aos dois setores que pretendo discutir com mais detalhe, Hematologia e Microbiologia, dispõem de recursos técnicos e humanos apropriados permitindo estabelecer diagnósticos diferenciais com qualidade, de modo a direcionar o tratamento de cada doente.

Em média, em todo o Serviço de Patologia Clínica, entram cerca de 1500 amostras diárias, o que perfaz um total de 4000 análises diárias.

3. Avaliação Externa de Qualidade

A avaliação externa de qualidade (AEQ) é um aspeto essencial no funcionamento do laboratório. A AEQ fornece uma forma de avaliar a performance analítica de qualquer laboratório, comparando-o com outros laboratórios utilizando diferentes métodos e equipamentos ou idênticos.

O objetivo da AEQ é desenvolver a comparação inter-laboratorial, que permite a normalização dos testes de diagnóstico. A AEQ mede a exatidão do laboratório usando “amostras cegas” que são analisadas como se tratasse de amostras de doentes. Os resultados são devolvidos ao organizador do programa para análise estatística. Posteriormente, os laboratórios recebem um relatório comparando a sua performance individual com a de outros participantes no programa. A AEQ permite assim, detetar falhas nos equipamentos, identificar problemas de reagentes, rever a formação da equipa e comparar diferentes métodos analíticos.

O **RIQAS** (Randox, Irlanda) é um AEQ acreditado pela norma ISO 13485:2003 para a conceção e fabrico de dispositivos médicos, reconhecido pelo UK National Quality Assurance Advisory Panel (NQAAP) for Clinical Pathology e reconhecido também pelo Joint Working Group on Quality Assurance (JWG QA). A sua periodicidade é mensal.

Outro programa que realiza uma análise retrospectiva dos resultados laboratoriais é o **NEQAS**, um programa de AEQ sediado no Reino Unido, acreditado pela norma ISO 17043 e certificado pela Clinical Pathology Accreditation.

4. Hematologia

Hematologia inclui o estudo das células sanguíneas e coagulação. Engloba análises de concentração, estrutura e função das células, os seus precursores na medula óssea e a função das plaquetas e proteínas (Saunders, 2011).

A secção de Hematologia dá resposta aos Hemogramas, Exames de esfregaço de Sangue Periférico, Gasimetrias, Velocidade de Sedimentação, Hemoglobina glicada e contagem diferencial de líquidos biológicos.

Para a realização de Hemograma, VS e HbA_{1c} as amostras de sangue total são colhidas em tubos de K₃EDTA, enquanto as gasimetrias são análises efetuadas em amostras de sangue arterial colhidas em seringa de heparina ou heparina-lítio.

4.1 Hemograma

O hemograma permite quantificar as células sanguíneas da circulação sanguínea e analisar a sua morfologia.

Os Sysmex XE-2100 e Sysmex XE-5000 são analisadores automáticos hematológicos, utilizados para a realização de hemogramas com estudo dos glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas. Para além das aplicações supracitadas, o Sysmex XE-5000 permite ainda fazer a contagem de eritroblastos e reticulócitos. Os Sysmex permitem ainda analisar fluidos corporais, como líquidos serosos, fluidos sinoviais e líquidos cefalorraquidianos. Apresentam contagens de leucócitos, diferenciação entre células mononucleares e polinucleares e contagem de eritrócitos presentes na amostra de fluidos corporais (Sysmex Corporation, 2008)(Sysmex Corporation, 2015).

Os dois analisadores automáticos permitem realizar análises a uma amostra num espaço de 60 segundos. Na sua totalidade o Sysmex XE-2100 permite analisar 24 parâmetros analíticos e o Sysmex XE-5000 avalia 67 parâmetros (ver tabela em Anexos), embora não sejam disponibilizados todos os parâmetros que os analisadores oferecem.

Os dois aparelhos apresentam 6 canais distintos: IMI, DIFF, RET/PLT-O, HGB, WBC/BASO e RBC/PLT.

- Canal IMI

No canal IMI é possível quantificar granulócitos imaturos, caso estejam presentes nas amostras, pelo método RF/DC (Sysmex Corporation, 2015).

- Canal DIFF

O canal DIFF permite, através de citometria de fluxo por fluorescência, detetar as diferentes populações leucocitárias (Sysmex Corporation, 2015).

- Canal HGB

A hemoglobina é analisada pelo detetor HGB, baseado no método de determinação de hemoglobina SLS. Este método utiliza surfactante laurilsulfato de sódio (SLS), que evita o recurso a cianeto. Este reagente lisa os glóbulos vermelhos e brancos da amostra. A reação química é iniciada pela alteração da globulina e oxidação do grupo Heme que se liga aos grupos hidrofílicos SLS formando um complexo estável e colorido (SLS-HGB). Este complexo é analisado pelo método fotométrico (Sysmex Corporation, 2015).

- Canal RBC

A contagem de eritrócitos e plaquetas é analisada pelo detetor RBC que usa o método de detecção por Focagem Hidrodinâmica. O analisador automático Sysmex XE-2100 recorre à impedância para fazer a contagem destas células (Sysmex Corporation, 2015).

- Canal RET/PLT-O

Os eritroblastos, reticulócitos e as plaquetas são analisados pelo detetor ótico baseado no método de citometria de fluxo por fluorescência usando um laser semiconductor (Sysmex Corporation, 2015). O parâmetro PLT-O garante uma maior precisão na contagem de plaquetas quando a sua concentração é baixa ou quando há interferentes.

- Canal WBC/BASO

Este canal permite diferenciar os basófilos dos restantes glóbulos brancos. Utiliza um reagente ácido que lisa os eritrócitos e diminui o tamanho dos glóbulos brancos à exceção

dos basófilos. As diferenças resultantes são analisadas por citometria de fluxo (Sysmex Corporation, 2015).

4.2 Metodologias

- Método de detecção RF/DC

O detector apresenta uma abertura entre dois eletrodos que permitem que haja passagem de uma corrente elétrica e rádio-frequência. O tamanho das células e a densidade no interior da célula, que permite identificar informações como o tamanho do núcleo, são detectados a partir de alterações da corrente elétrica e rádio-frequência respectivamente. Essas alterações são transmitidas a partir de pulsos elétricos. O tamanho desses pulsos elétricos permite realizar uma distribuição bidimensional, criando um citograma (Sysmex Corporation, 2008).

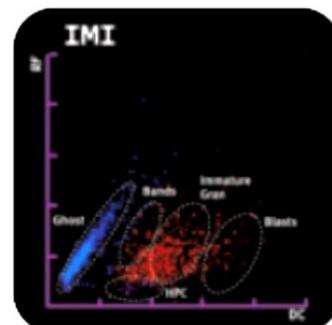


Figura 1 - Citograma pelo método RF/DC.

- Método de detecção por Focagem Hidrodinâmica

No método de detecção por Focagem Hidrodinâmica as células passam pela abertura de detecção linearmente, com a presença de um reagente que impede o refluxo. O método aumenta a eficácia da contagem de células prevenindo interferências ou pulsos elétricos artificiais (Sysmex Corporation, 2008).

- Método de citometria de fluxo por laser semiconductor

A citometria de fluxo permite analisar características químicas e fisiológicas de células e outras partículas biológicas. Essas características são determinadas através de zonas de detecção sensíveis. A citometria de fluxo por fluorescência analisa as propriedades fisiológicas e químicas das células. A amostra de sangue é marcada após a aspiração com um marcador fluorescente que se liga especificamente aos ácidos nucleicos (Sysmex Corporation, 2008).

Quando as células passam pelo laser semiconductor, a luz espalha-se em várias direções. Ao detectar essa refração de luz é possível obter informação sobre o tamanho e estrutura da

célula. No caso dos Sysmex XE-5000 e XE-2100 detetam a intensidade da luz *forward scatter* (FSC), que oferece informação sobre o tamanho da célula, a intensidade de luz *lateral scatter* (SSC) que informa sobre a complexidade da célula e, por fim, a intensidade de luz *lateral fluorescence*, indicando a quantidade de ADN ou ARN existente no interior das células, separando as populações celulares através de programas que criam os citogramas (Sysmex Corporation, 2008).

O software utilizado pelos Sysmex, SIS, avalia a análise parametrizada e, considerando o valor determinado em relação ao valor de referência e o histórico do utente, este será validado automaticamente e enviado para o Clinidata XXI.

Em caso de incongruência com o histórico ou o valor de referência, a validação será assegurada pelo técnico, considerando a verosimilhança com as restantes análises ou diagnóstico clínico.

Quando um determinado parâmetro se encontra fora dos valores de referência, ou apresenta um delta-check, ou seja, uma variação de um parâmetro analisado previamente no mesmo doente, que excede um limite de variância estipulado, o aparelho emite *flags*, mensagens de aviso, permitindo que o técnico de saúde tome controlo e valide manualmente o hemograma.

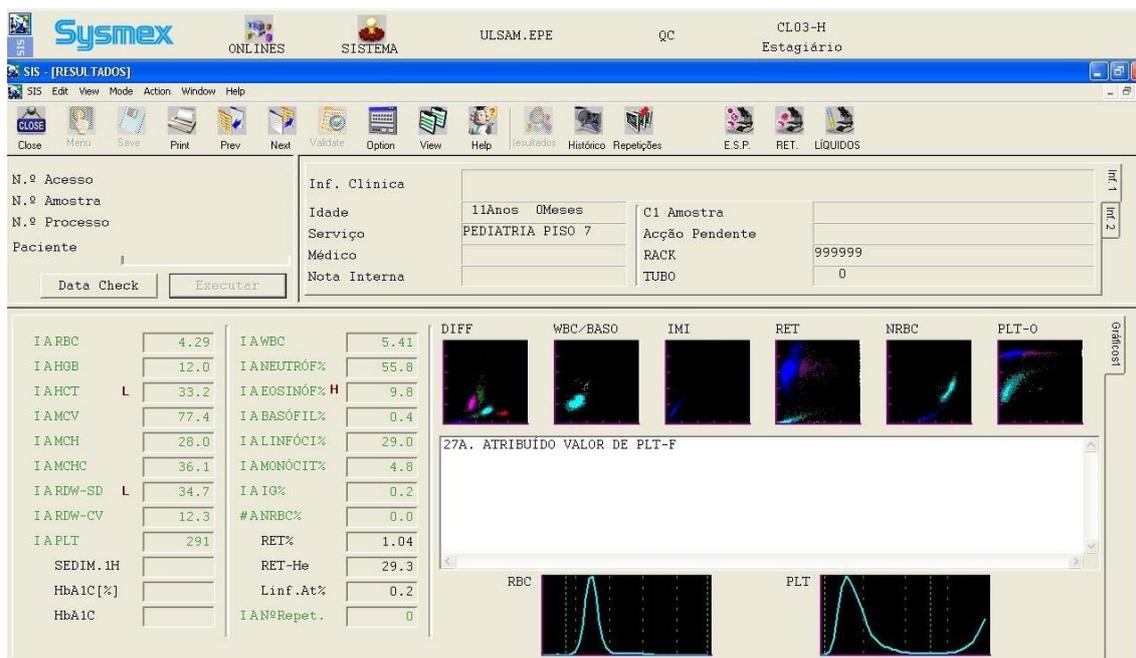


Figura 2 - Exemplo de hemograma validado automaticamente pelo SIS.

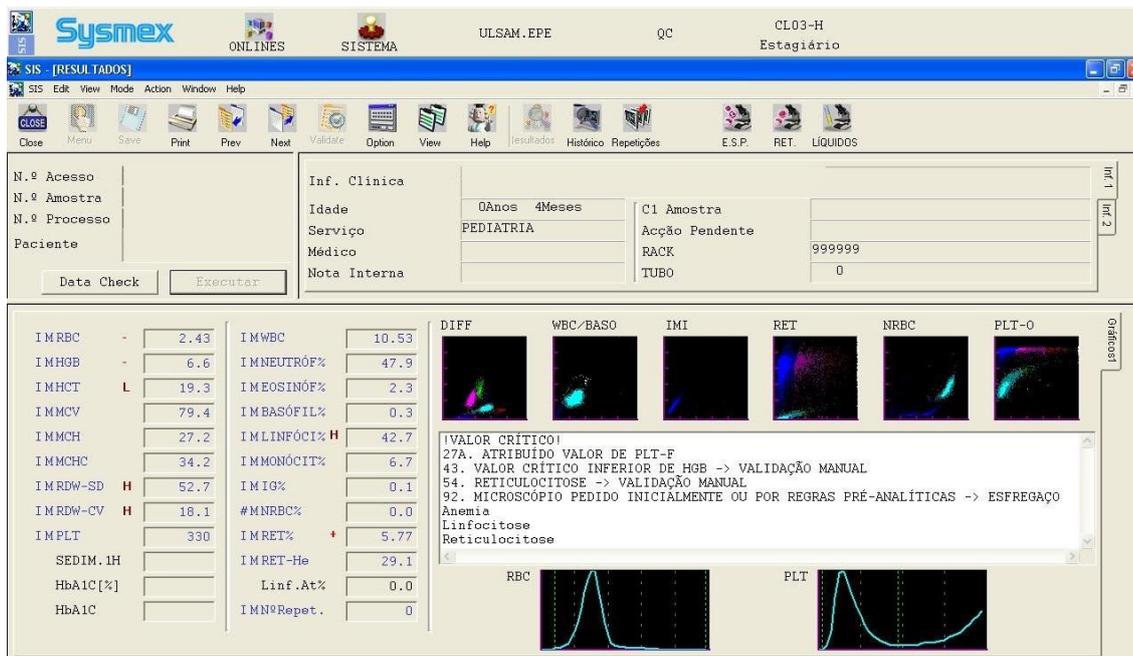


Figura 3 - Exemplo de hemograma que apresenta flags pelo SIS.

A creditação de cada resultado é assegurada pela presença de um controlo de qualidade interno utilizado diariamente, apresentando três níveis: Nível baixo, nível médio e nível alto (Sysmex Corporation, 2008).

4.3 Índices Eritrocitários

Os índices eritrocitários permitem avaliar quantitativamente os eritrócitos através do hematócrito, da hemoglobina e da concentração de eritrócitos por unidade de volume. As características qualitativas são avaliadas através do volume corpuscular médio, da hemoglobina corpuscular média e da concentração da hemoglobina corpuscular média (Geer et al., 2013).

4.3.1 Hematócrito (HCT)

O hematócrito é a porção de volume ocupada pelos eritrócitos numa amostra de sangue total após centrifugação. Os analisadores automáticos não dependem da centrifugação. Determinam o Hct a partir da contagem de eritrócitos e do volume corpuscular médio (Geer et al., 2013).

$$Hct(L/L) = RBC(n^{12}/L) \times VCM(fL)$$

4.3.2 Hemoglobina (HGB)

A hemoglobina é uma proteína ligada ao eritrócito especializada nas trocas gasosas de oxigênio e dióxido de carbono. A sua diminuição provoca várias patologias conhecidas por anemias (Hoffbrand e Moss, 2013).

4.3.3 Volume Corpuscular Médio (VCM)

O VCM permite avaliar o volume médio dos eritrócitos, podendo assim classificar as anemias. Caso o VCM esteja aumentado ocorre uma macrocitose, caso seja reduzido uma microcitose (Geer *et al.*, 2013).

$$VCM(fL) = \frac{HCT(\%)}{N^{\circ} \text{ de } GV(10^6/\mu L)} \times 10$$

4.3.4 Hemoglobina Corpuscular Média (HGM)

A Hemoglobina Corpuscular Média é o parâmetro que avalia a quantidade de hemoglobina no eritrócito. O decréscimo de HGM, como se sucede em anemias por deficiência de ferro, indica que a quantidade de hemoglobina também diminuiu. Os analisadores automáticos utilizam a seguinte fórmula:

$$HGM (pg) = \frac{HGB(g/dL) \times 10}{N^{\circ} \text{ de } GV(10^6/\mu L)}$$

4.3.5 Concentração da Hemoglobina Globular Média (CHGM)

Este parâmetro avalia a concentração média de hemoglobina no eritrócito e é calculada pelo analisador automático da seguinte forma:

$$CHGM(g/dL) = \frac{HGB(\frac{g}{dL})}{HCT(\%)} \times 100$$

É este parâmetro que avalia se o eritrócito se encontra hipocrômico, normocrômico ou hiperocrômico (Geer *et al.*, 2013).

4.3.6 Red Cell Distribution Width (RDW)

O RDW eritrocitário é um parâmetro que avalia a heterogeneidade do tamanho celular dos eritrócitos. É útil na identificação de fragmentos eritrocitários, aglutinação ou populações dimórficas, como acontece em anemias sideroblásticas ou em doentes que tenham sofrido transfusões (Geer *et al.*, 2013).

4.4 Gasimetria

Para responder aos pedidos de gasimetrias, o Serviço tem à sua disposição dois aparelhos automatizados, o GEM 3500 e o GEM 4000. Fornecem medidas quantificáveis de parâmetros como pH, gases no sangue, sódio, potássio, cloro, cálcio ionizado, glucose, lactato, hematócrito e CO-Oximetria (tHb, O₂Hb, COHb, MetHb e HbA_{1c}), ajudando no diagnóstico do estado ácido/base do paciente, capacidade de transporte de oxigénio e equilíbrio eletrolítico e metabólico.

A gasimetria arterial é o teste mais comum para analisar doentes dos cuidados intensivos. Oferece informações sobre a oxigenação, ventilação e o balanço ácido-base.

Todo o cuidado é pouco na colheita de sangue arterial, sendo fundamental que não haja presença de bolhas de ar ou de heparina em excesso. A temperatura da amostra também deve ser mantida à temperatura do doente na hora da colheita (Thorson *et al.*, 1983)(JE e DH, 1977).

Quando a colheita é difícil devido à baixa pressão sanguínea, o teste alternativo é a gasimetria venosa. Torna-se uma colheita mais acessível quando o doente tem um cateter venoso central como acontece nos cuidados intensivos.

Os resultados obtidos da gasimetria venosa servem para estimar os valores arteriais correspondentes. Este teste mede a pO₂, pCO₂, pH, saturação da oxihemoglobina e concentração de HCO₃. A pO₂, pH venoso e concentração de HCO₃ venosa são utilizados para determinar a ventilação e o estado ácido-base. A saturação da oxihemoglobina é

necessária para situações severas de sépsis ou choque séptico (Byrne *et al.*, 2014)(Middleton *et al.*, 2006).

Tanto o GEM 3500 e o GEM 4000 utilizam sensores potenciométricos para medir $p\text{CO}_2$, pH, Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{2+} . Na medição de $p\text{O}_2$ e concentrações de glicose e lactato utilizam sensores amperométricos.

A condutividade sanguínea é o método utilizado para medir o hematócrito.

A medição de CO-Ox envolve lise química da amostra de sangue total e é avaliada numa variedade de comprimentos de onda através de um espectrómetro. O ciclo de processamento da amostra é fechado evitando qualquer tipo de interferência ou contaminação durante a análise.

Tabela 1- Parâmetros analisados pelo GEM 4000 e GEM 3500.

Parâmetros	Funções
pH $p\text{CO}_2$ HCO_3^- TCO_2	<i>Definem o estado ácido-base.</i>
$p\text{O}_2$ arterial	Indica a eficácia da troca de oxigénio.
Na^+	Crítico na distribuição de água e pressão osmótica nos tecidos corporais.
K^+	Crítico na manutenção neuromuscular incluindo funções respiratórias e função do miocárdio.
Ca^+	Funções de hemóstase.
Cl^-	Mantém a neutralidade elétrica, Alterações dos níveis de cloro acompanham as perdas ou excessos de sódio.
Hematócrito	<i>Determina a capacidade de transporte de oxigénio.</i>
Glicose	Fonte de energia primária.
Lactato	A sua produção indica lesão tecidual com privação de oxigénio, como descompensação cardíaca ou insuficiência pulmonar.
CO-Ox	Avalia a capacidade de transporte de oxigénio no sangue, determinando a percentagem de hemoglobina funcional.

Estes dois equipamentos possuem um controlo de qualidade interno denominado Intelligent Quality Management (iQM). É um programa de qualidade criado para monitorizar continuamente o processo analítico em real-time, detetando erros automaticamente. Permite registar esses erros e corrigi-los sem intervenção humana.

Os equipamentos são também sujeitos a uma AEQ, avaliando desta forma a adequada performance dos equipamentos.

4.5 Velocidade de Sedimentação

A velocidade de sedimentação possibilita a medição da fase aguda de resposta a uma doença inflamatória, avaliando a rapidez com que sedimentam os eritrócitos. O valor da VS é influenciado substancialmente pela concentração de algumas proteínas, cuja concentração plasmática se modifica em situações inflamatórias, bem como na presença de patologias, como por exemplo, neoplasias. A VS também é influenciada por algumas propriedades dos eritrócitos e pelo grau de anemia. A VS varia por idade, sexo e grupos étnicos (Vennapusa et al., 2011).

O Ves Matic Cube 30 é um aparelho automático que permite determinar a VS até um máximo de 30 amostras de sangue por ciclo de trabalho. Uma das vantagens é a utilização do mesmo tipo de tubo usado nos equipamentos Sysmex XE-2100 e XE-5000, o que evita uma colheita dupla ou um transvase de material biológico.

O exame hemocromocitométrico é executado em completa automatização, recorrendo a uma homogeneização da amostra e leitura ótica da sedimentação. O aparelho utiliza o método de Westergren modificado. Permite obter resultados em 30 minutos após a homogeneização da amostra.

Através de um leitor ótico-eletrônico, o equipamento regista a sedimentação e de seguida imprime os resultados e envia-os para o *software* Clinidata XXI.

```

VES MATIC 20
*****
CYCLE ----- 1
SELECT ----- F1
TEMPERATURE ----- ON
Q.C. ----- OFF
DATE (MM/DD/YY) 06/27/15
TIME (HH:MM:SS) 17:06:78

POS      ID          WEST
NUM      ID          IH
1 = 129578... 59
2 = SAMPLE ABSENT
3 = SAMPLE ABSENT
4 = SAMPLE ABSENT
5 = SAMPLE ABSENT
6 = SAMPLE ABSENT
7 = SAMPLE ABSENT
8 = SAMPLE ABSENT
9 = SAMPLE ABSENT
10 = SAMPLE ABSENT
11 = SAMPLE ABSENT
12 = SAMPLE ABSENT
13 = SAMPLE ABSENT
14 = SAMPLE ABSENT
15 = SAMPLE ABSENT
16 = SAMPLE ABSENT
17 = SAMPLE ABSENT
18 = SAMPLE ABSENT
19 = SAMPLE ABSENT
20 = SAMPLE ABSENT
    
```

Figura 4 - Exemplo de resultado de velocidade de sedimentação.

4.6 Hemoglobina glicada

O termo hemoglobina glicada descreve uma variedade de alterações que têm em comum a glicação da hemoglobina, na qual é realizada uma ligação não-enzimática de glucose ou outra hexose à molécula de hemoglobina. Esta variante de hemoglobina encontra-se relacionada com a *Diabetes Mellitus* devido ao desequilíbrio da quantidade de glucose existente na corrente sanguínea (Henrichs e R., 2009).

A avaliação desta HbA_{1c} permite um controlo mais eficaz de doentes com *Diabetes Mellitus*, visto que esta hemoglobina glicada só é eliminada pelo organismo após o término de vida do eritrócito. Torna-se assim, durante o tempo médio de vida dos eritrócitos de 120 dias, um parâmetro importante para estudar o doente e verificar se tem os cuidados necessários para controlar a glucose (Henrichs e R., 2009).

Para a monitorização da presença de hemoglobina glicada é utilizado o aparelho automático ADAMS A1c HA-8160. Baseia-se no método de HPLC, por cromatografia de troca iónica em fase inversa. As frações de hemoglobina são separadas através de interações electrostáticas com o gel da coluna. A leitura é realizada a dois comprimentos de onda, 415 e 500nm.

Tabela 2 - Fases de processamento da amostra no HA-8160.

Fase	Função
Coluna	Separa as frações de hemoglobina.
Eluente A	Elui as frações de Hb com uma carga inferior a HbA_0
Eluente B	Elui todas as variantes de Hb numa fração independente das outras.
Eluente C	Elui HbA_0
Hemolisante H	Hemolisa a amostra de sangue e remove a fração lábil.

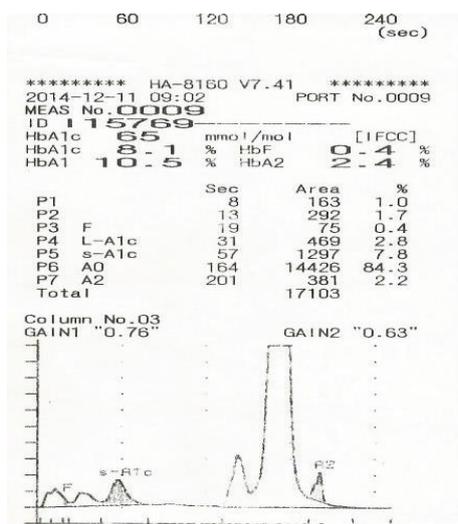


Figura 5 - Exemplo de um resultado do HA-8160 com 8,1% de HbA1c.

4.7 Avaliação morfológica através de um esfregaço sanguíneo periférico

A avaliação cuidada de um esfregaço sanguíneo periférico é importante para determinar certas doenças hematológicas. Os esfregaços sanguíneos são realizados a partir dos tubos que contêm anticoagulante, preparados para serem analisados pelos analisadores automáticos.

Os esfregaços são realizados manualmente sendo necessária uma lâmina de vidro e um adaptador que perfura a tampa do tubo de sangue total. Após a homogeneização do tubo inicia-se o processo, libertando uma gota de sangue do tubo através do adaptador numa das extremidades da lâmina. Com o adaptador realiza-se um deslize contínuo permitindo que fique bem presente 3 fases visíveis:

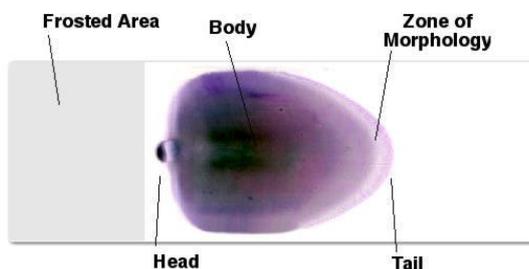


Figura 6 - Lâmina com esfregaço sanguíneo periférico corada pela coloração de Wright.

Para corar as lâminas de esfregaço sanguíneo periférico utiliza-se um equipamento projetado para esse propósito. O Hema-Tek 1000 utiliza um suporte de espirais que se encontram em rotação, transportando as lâminas para a área de coloração. Nesta área as lâminas passam por três sensores mecânicos que acionam a solução ao qual estão ligados. Na primeira fase a

lâmina vai acionar a libertação de corante de Wright com metanol permitindo uma fixação do esfregaço na lâmina e a sua coloração. Os últimos dois sensores acionam a solução tampão e de lavagem. Posteriormente, a lâmina vai secando ao longo do corredor do equipamento terminando, depositada, no recipiente, pronta para ser visualizada.

Para uma avaliação adequada deve-se escolher uma área da lâmina onde os eritrócitos se encontrem igualmente espaçados, sem se verificar qualquer tipo de arrastamento celular ou desintegração celular.

Se, por ventura, esta área apresentar uma distribuição de eritrócitos anormais, isto pode dever-se a várias condições médicas, como por exemplo:

- ✓ Formação de Rouleaux – Nesta condição as células apresentam-se organizadas como uma pilha de moedas. Isto é comum em pacientes com Mieloma Múltiplo, mas também está presente em pacientes com aumento de fibrinogénio ou proteínas totais de várias causas (Geer *et al.*, 2013).
- ✓ Aglutininas frias – provocam aglomeração irregular dos eritrócitos quando a temperatura é inferior a 37°C (Geer *et al.*, 2013).

4.7.1 Avaliação morfológica dos glóbulos vermelhos

Os glóbulos vermelhos apresentam um tamanho uniforme tanto em tamanho como estruturalmente, num esfregaço sanguíneo periférico normal. O seu tamanho varia entre 7.2 a 7.9µm de diâmetro. Uma variação destes valores nos glóbulos vermelhos é chamada de anisocitose. Glóbulos vermelhos mais imaturos são macrocíticos e apresentam uma cor cinza, policromasia, ou têm a presença de pontuado basofílico devido a resíduos de ARN e ribossomas, como acontece nos percursores dos eritrócitos, os reticulócitos que se encontram em situações patológicas como anemias (Geer *et al.*, 2013).

Os eritrócitos normalmente apresentam-se redondos, uma variação na estrutura do eritrócito denomina-se de poiquilocitose. No geral, os eritrócitos apresentam-se com uma palidez central e um contorno avermelhado devido à presença de hemoglobina. Uma distribuição anormal da hemoglobina pode inverter esta estrutura do eritrócito, levando a uma aglomeração de hemoglobina no centro da célula, dando o nome de células alvo.

O aumento da espessura da membrana pode trazer hipercromia, situação anormal apresentada em esferócitos e macrócitos (Geer *et al.*, 2013).

4.7.2 Avaliação das plaquetas

As plaquetas encontram-se presentes como fragmentos citoplasmáticos azuis. Variam entre 1µm e 2µm de diâmetro e, num esfregaço sanguíneo periférico, deve haver entre 5 a 15 plaquetas por campo microscópico na objetiva de 100x (Geer *et al.*, 2013).

Em certas situações verifica-se a necessidade de averiguar se há presença de aglomerados plaquetares para rejeitar a hipótese de trombocitopenia, que consiste na diminuição de plaquetas a circular no sangue periférico (Geer *et al.*, 2013).

4.7.3 Avaliação dos glóbulos brancos

Os glóbulos brancos que se encontram presentes no sangue periférico, e podem ser visíveis num esfregaço, inclui neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos e basófilos.

A presença de células imaturas, como linfoblastos ou promielócitos, é anormal sendo necessário realizar uma contagem de células imaturas e informar o médico prescritor, que poderá solicitar colaboração do colega hematologista clínico.

Quando se observam os glóbulos brancos, é feita uma contagem diferencial manual, para confirmar a contagem que o Sysmex realizou na sua análise automática. É necessário identificar as populações que apresentem alterações morfológicas, tanto do citoplasma como do núcleo. Por exemplo, uma infeção promove o aparecimento de granulações tóxicas nos neutrófilos.

4.8 Alterações Patológicas na linhagem eritrocitária

- Anemia

A anemia indica deficiência na série rubra, havendo vários tipos de alterações conhecidas.

Tabela 3 - Principais alterações nos eritrócitos

Alteração	Característica
Anisocromática	Distribuição irregular da hemoglobina no eritrócito
Anisocitose	Variação do tamanho da população eritrocitária
Hipocromia	Diminuição da hemoglobina no eritrócito
Microcitose	Eritrócitos de tamanho reduzido
Poiquilocitose	Formas irregulares dos eritrócitos

As anemias podem estar sub-divididas em vários grupos. Geralmente são agrupadas de acordo com o tamanho e cor dos eritrócitos.

- Anemia Hipocrômica Microcítica

A causa mais comum de anemia hipocrômica microcítica é por deficiência em ferro, em que os índices eritrocitários, como o volume corpuscular médio e a hemoglobina corpuscular média, encontram-se reduzidos. Os eritrócitos apresentam-se com tamanho reduzido e pálidos (Hoffbrand e Moss, 2013).

Tabela 4 - Outras causas de Anemia por Deficiência em Ferro.

Anemia por Deficiência em Ferro	
Deficiência na utilização do ferro	É denominada de anemia sideroblástica, caracterizada pela produção ineficaz de ferro e presença de ferritina nos eritrócitos.
Deficiência na reutilização do ferro	Relacionada com doenças crônicas, infecções e cancros.
Deficiência no transporte de ferro	Uma condição rara – atransferrinemia.

- Anemia Normocrômica Normocítica

Este tipo de anemia ocorre devido a uma diminuição na produção de glóbulos vermelhos. Isto pode dever-se a fatores como falha renal crônica, causando uma redução do tempo de vida dos eritrócitos. A sua compensação a partir da libertação de eritropoietina, pelas glândulas supra-renais, torna-se ineficaz (Barnes, 2010).

Outro fator menos comum é a falha parcial da medula óssea na produção de todos os tipos de células sanguíneas, denominada de anemia aplástica. Pode ser causada por drogas terapêuticas, toxinas químicas ou infecções víricas (Barnes, 2010).

- Anemia por destruição excessiva de eritrócitos

A anemia é definida como uma anemia hemolítica, em que há lise dos eritrócitos com a liberação da hemoglobina. Pode ocorrer por condições genéticas que inclui deficiência na enzima G6PD (Barnes, 2010) ou condições hereditárias.

Tabela 5 - Exemplos de Anemias por destruição de eritrócitos.

Esferocitose hereditária	Eritócitos microcíticos esféricos. A sua membrana celular rompe facilmente.
Anemia Falciforme	Hemoglobina anormal, HbS, que precipita numa estrutura cristalina na presença de oxigênio, alterando a membrana celular dando uma forma de foice ao eritrócito. Anisocitose e poiquilocitose estão presentes.
Talassémias	Formação incompleta da hemoglobina. Causa produção de eritrócitos hipocrômicos e microcíticos que lisam na medula óssea.
Eritroblastose fetal	Os eritrócitos do feto são atacados por anticorpos da mãe.

- Anemia Megaloblástica

Este tipo de anemia é também chamada de anemia perniciosa e é provocada pela deficiência de vitamina B12 e ácido fólico.

Tabela 6 - Causas de deficiência de vitamina B12 e/ou ácido fólico.

Dieta insuficiente ou restrita (Ex. Vegetarianismo)
Lesões gástricas
Gastrectomia
Inflamações intestinais
Parasitas
Síndrome da mal absorção
Alcoolismo
Gravidez

4.9 Alterações patológicas nas linhagens mieloide e linfoide

O estudo da população leucocitária permite avaliar presença de estados infecciosos ou leucémicos. São várias as causas de aumento da população (sufixo –ose ou –filia) e de redução da população (sufixo –penia). As causas mais comuns serão apresentadas nas tabelas seguintes:

Tabela 7 - Alterações e causas patológicas da linhagem mieloide (Hoffbrand e Moss, 2013).

Linhagem Mieloide	Alterações	Causas
Neutrófilos	Neutrofilia	Infeções bacterianas; Inflamação e necrose tecidual; Doenças metabólicas; neoplasias; Hemorragias; LMC; Fármacos.
	Neutropenia	Síndrome de Kostmann; Benigna; Autoimune; LES; Hipersensibilidade; Infeções virais ou bacterianas.
Monócitos	Monocitose	Infeções bacterianas crónicas; neutropenia crónica; Linfoma de Hodgkin; Leucemia mieloide aguda; Leucemia mielomonocítica crónica.
Eosinófilos	Eosinofilia	Doenças alérgicas; Doenças parasitárias; Síndrome hipereosinofílica; Sensibilidade a terapêuticas.
Basófilos	Basofilia	Leucemia mieloide crónica; Policitemia vera.

Tabela 8 - Alterações e causas patológicas da linhagem linfoide (Hoffbrand e Moss, 2013).

	Alterações	Causas
Linfócito	Linfocitose	Infeções agudas: mononucleose infecciosa, rubéola, linfocitose infecciosa aguda. Infeções crónicas: tuberculose, toxoplasmose, sífilis. Leucemias linfoides crónicas, Leucemia linfoblástica aguda.
	Linfopenia	Insuficiência da medula óssea; tratamento com corticosteroides; Linfoma de Hodgkin; HIV.

4.10 Alterações patológicas da linhagem plaquetar

As plaquetas são produzidas na medula óssea por fragmentação do citoplasma dos megacariócitos, umas das maiores células do nosso organismo. As plaquetas atuam na resposta hemostática ao dano vascular, juntamente com os fatores de coagulação. São muito pequenas e discoides e revestem-se de glicoproteínas que permitem a adesão e agregação

aos tecidos danificados levando à formação do tampão plaquetário durante a hemostasia (Hoffbrand e Moss, 2013).

Tabela 9 - Alterações patológicas que causam Trombocitopenia (Abbott, 2003).

Trombocitopenia	
Tipo	Causas
Diminuição da produção de plaquetas	Agentes tóxicos, infecções, radiação, anemias, alterações genéticas.
Distribuição anormal de plaquetas	Cancro
Diminuição do volume plaquetar	Transfusão sanguínea extrema.
Destruição anormal plaquetar	Coagulação disseminada intravascular, vasculites, trombocitopenia trombótica púrpura, heparina, antibióticos, leucemias, linfomas.

Tabela 10 - Alterações patológicas que causam Trombocitose (Abbott, 2003).

Causas	
Trombocitose	Cancro; Doenças inflamatórias; Esplenectomia; Deficiência em ferro.

4.11 Espermogramas

Na secção de Hematologia são realizados espermogramas para a consulta de fertilidade e serviço de urologia.

Para efetuar a análise do líquido seminal é necessário um período de abstinência sexual de 2 a 7 dias. A amostra é colhida para um frasco estéril e deve ser mantida a 37°C. Durante este período a amostra deve ser homogeneizada por agitação ligeira. Ao fim de 30 minutos, com a amostra liquefeita, são avaliadas as características macroscópicas, bioquímicas e as microscópicas, sendo que todos os parâmetros devem ser avaliados o mais rapidamente possível, particularmente a mobilidade (WHO, 2010).

Características macroscópicas*Tabela 11 - Características estudadas num espermograma e valores de referência.*

Características	Referência
Cor	Esbranquiçada
Aspeto	Opalescente
Cheiro	<i>Sui-generis</i>
Volume	≥1,5 mL
Viscosidade	Gota a gota = Normal
Liquefação até 60 minutos	<i>Completa</i>

4.1.1.1 Anomalias registadas na avaliação macroscópica

Liquefação: Uma amostra liquefeita apresenta-se homogénea sem grumos nem coágulos. Quando a ejaculação ocorre, o sémen encontra-se como uma substância semissólida coagulada e em poucos minutos começa liquificar.

Por vezes é encontrado muco e corpos gelatinosos. Não apresentam importância clínica, mas dificultam a análise microscópica.

Quando a liquefação ultrapassa os 60 minutos, é necessário registar a anomalia e recorre-se a um método que auxilie a liquefação e homogeneização da amostra, como por exemplo, a diluição da amostra com tampão PBS.

Viscosidade: Uma viscosidade anormal está presente quando há um filamento de mais de 2 cm no ensaio gota a gota. Uma viscosidade elevada interfere praticamente com todas as determinações.

Para eliminar a viscosidade realiza-se o mesmo tratamento que na ausência de liquefação.

Aspeto: O sémen que apresenta um aspeto translúcido tem uma baixa concentração de espermatozoides. Quando se suspeita de uma azoospermia, é necessário concentrar a amostra.

O sémen que apresenta um aspeto avermelhado indica presença de sangue devido a uma infeção ou traumatismo no trato genital.

O aspeto amarelado é indicativo de icterícia. Também pode indicar altos níveis de flavoproteínas oxidadas, procedentes das vesículas seminais, indicando uma elevada abstinência.

Volume: Um volume inferior a 1,5mL é indicativo de:

- Obstrução das vias seminais.
 - Ejaculação retrógrada, uma patologia na qual o sémen não segue a sua via de saída natural, pela uretra, seguindo para a bexiga misturando-se com a urina.
- Um volume alto pode ser produzido devido a uma inflamação.

4.11.2 Características bioquímicas

O pH é a característica bioquímica avaliada. Reflete o balanço das diferentes secreções, principalmente entre o pH alcalino das vesículas seminais e o ácido da próstata.

Um pH inferior a 7, relacionado com oligo ou azoospermia e um volume baixo, sugere agenesia ou obstrução das vesículas seminais. Impede a saída total dos espermatozoides, baixando a concentração espermática.

4.11.3 Avaliação microscópica

Na avaliação microscópica faz-se um estudo da motilidade, vitalidade, concentração de espermatozoides e a sua morfologia.

4.11.4 Motilidade

A motilidade dos espermatozoides deve ser avaliada o mais rapidamente após a liquefação da amostra, evitando a desidratação ou alterações de pH e temperatura (WHO, 2010).

Através de um exame a fresco, avalia-se a motilidade em três aspetos: motilidade progressiva, motilidade não-progressiva e imotilidade (WHO, 2010).

Motilidade progressiva é definida como o movimento ativo e linear do espermatozoide.

No caso da motilidade não-progressiva, esta representa todos os movimentos que não originam progresso no campo de visão, como por exemplo, movimentos circulares ou pequenos movimentos flagelares (WHO, 2010).

A imotilidade representa a falta completa de movimento (WHO, 2010).

4.11.5 Vitalidade

A vitalidade dos espermatozoides é estimada pela avaliação da integridade das células.

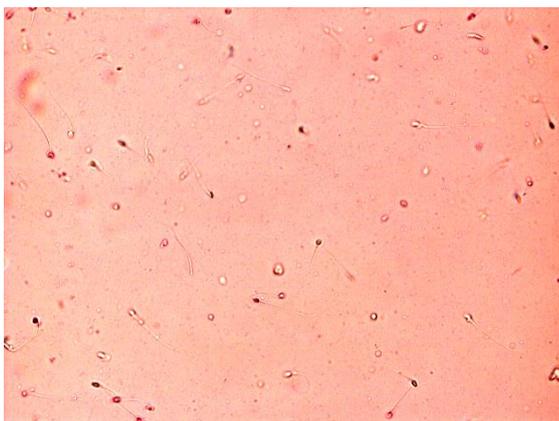


Figura 7 - Avaliação da vitalidade através da coloração de eosina.

A percentagem de espermatozoides vivos é determinada após o teste de eosina. A eosina, um corante ácido, cora de vermelho os espermatozoides mortos que se encontram com a membrana destruída, contrastando com os espermatozoides vivos com membrana intacta, bloqueando a entrada do corante (WHO, 2010).

4.11.6 Concentração dos espermatozoides

A contagem dos espermatozoides na amostra é realizada numa câmara de Neubauer. Após a contagem calcula-se a concentração dos espermatozoides tendo em conta a diluição e o número de quadrantes contados (WHO, 2010).

É realizada uma contagem dupla em que a diferença entre as contagens não pode ultrapassar os 2%.

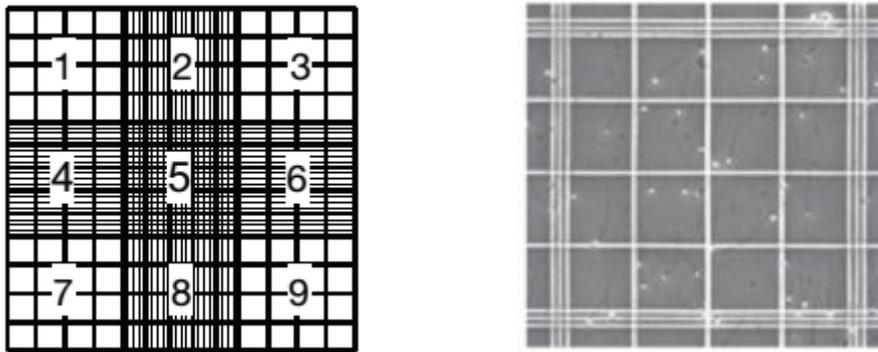


Figura 8 - Demonstração de uma câmara de contagem e visualização real de um dos quadrantes da câmara de Neubauer (WHO, 2010).

4.11.7 Morfologia

A avaliação morfológica é feita em esfregaço do líquido em lâmina corada com a coloração de Papanicolau.

Os espermatozoides apresentam três estruturas diferenciadas: a cabeça, a peça intermédia (ou colo) e a cauda:

- A cabeça apresenta uma estrutura oval e é constituída pelo núcleo e o acrossoma.
- A peça intermédia assegura a ligação da cauda com a cabeça estando inserida de forma central e simétrica na cabeça. Contém citoplasma e filamentos axiais rodeados por mitocôndrias.
- A cauda é alongada e helicoidal.

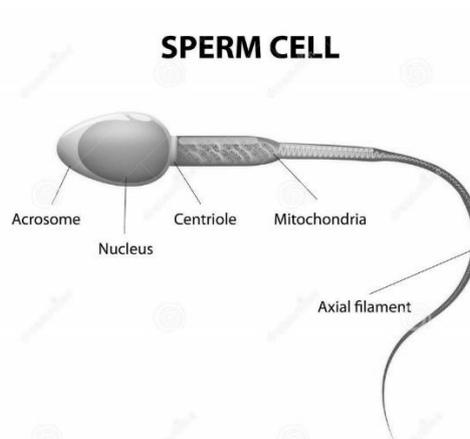


Figura 9 - Diagrama de um espermatozoide normal (Dreamstime, 2015).

Realiza-se uma contagem de 200 células registrando as células que contêm anomalias da cabeça, do colo e/ou da cauda. São também avaliados espermatozoides que contêm restos citoplasmáticos, que representam imaturidade celular, indicativo de uma disfunção epididimal afetando a maturação (Phadke e Mortimer, 2007).

Os espermatozoides podem apresentar de uma a quatro anomalias.

Após a contagem é calculado o índice de teratozoospermia, que é definido pelo número de anomalias presentes por número de espermatozoides anormais (Phadke e Mortimer, 2007).

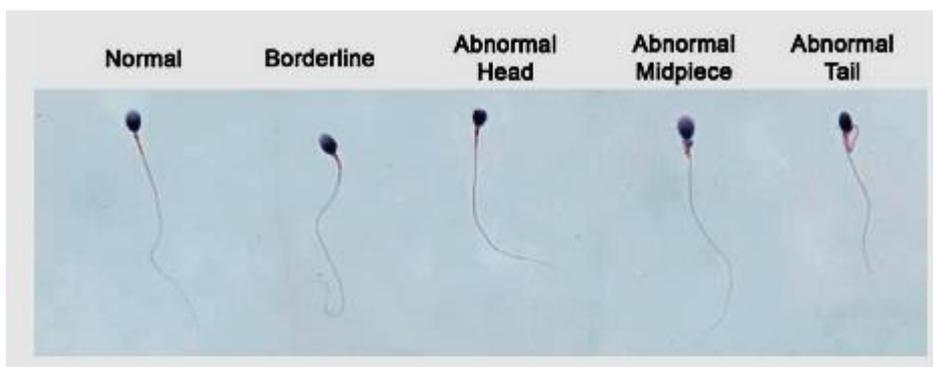


Figura 10 - Exemplo de um espermatozóide normal e de espermatozóides anormais (WHO, 2010).

4.11.8 Presença de células imaturas

A presença de células imaturas, indica desordens na espermatogênese.

Geralmente no sémen são encontradas espermátides redondas e espermatócitos e, raramente, espermátogônias. Para diferenciar as células imaturas dos leucócitos utiliza-se a coloração de Papanicolau, tendo como observação principal o núcleo e o tamanho celular.

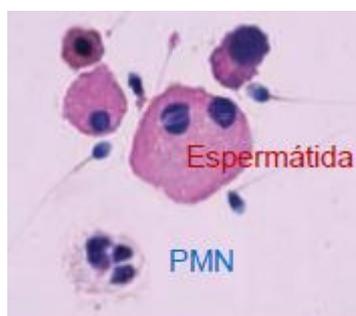


Figura 11 - Diferença entre leucócitos polimorfonucleares e uma espermátide (WHO, 2010).

4.11.9 Leucócitos

Os leucócitos são quantificados durante a avaliação morfológica do líquido seminal, é importante no diagnóstico de infertilidade masculina.

Um número elevado de leucócitos associa-se a uma infeção e pobre qualidade espermática.

Infeções na próstata são caracterizadas pela diminuição de zinco no sémen, levando a uma oligozoospermia severa, diminuição drástica da concentração de sémen, ou até a uma azoospermia.

Em último caso, infeções das vesículas seminais, geralmente por tuberculose, resultam numa redução de volume e conteúdo de frutose no ejaculado (Phadke e Mortimer, 2007).

Os leucócitos, durante o combate à infeção, promovem a estimulação de espécies reativas de oxigénio (ROS), reduzindo a motilidade e função dos espermatozoides.

Tanto o local, como o tipo de infeção, promovem várias alterações que condicionam a fertilidade.

Infeções do epidídimo podem causar azoospermia obstrutiva (Phadke e Mortimer, 2007).

5. Microbiologia

Na secção de Microbiologia são realizados vários tipos de análises a produtos biológicos diversos, que consistem na identificação do microrganismo patogénico e da sua suscetibilidade a antibióticos. As amostras entram no serviço após o registo feito pelos administrativos do serviço de Patologia Clínica, os quais etiquetam as amostras e as suas respetivas requisições. O técnico verifica se não há qualquer troca na identificação de amostra e analisa os pedidos efetuados pelo médico, preparando assim todo o material necessário para a sementeira.

5.1 Inoculação em meios de cultura

A inoculação é um processo de isolamento de microrganismos em cultura, em que se retira o microrganismo do local de infeção pelos meios de colheita apropriados e inocula-se num ambiente artificial, como um meio de cultura (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).

Essa transição do ambiente *in vivo* para o ambiente *in vitro* requer necessidades ambientais e nutrientes favoráveis para o crescimento dos microrganismos (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).

Os meios de crescimento podem apresentar-se em estado líquido (caldo nutritivo) e/ou fase sólida (agar) (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).

Nos meios com caldo nutritivo, os nutrientes encontram-se dissolvidos em água e o crescimento microbiano apresenta-se através da turvação do meio, quanto maior for o crescimento microbiano maior será a turvação (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).

Num meio sólido encontra-se presente um agente solidificante que aguenta temperaturas altas de esterilização sem que se liquidifique (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).

Os meios de cultura, no diagnóstico laboratorial, são divididos em quatro categoriais: enriquecimento, não seletivos, seletivos e diferenciais (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).

- Meios de enriquecimento contêm nutrientes específicos que permitem o crescimento de um determinado microrganismo patogénico que pode estar presente isoladamente ou com outros microrganismos comensais, sem valor clínico (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).

- Meios não seletivos contêm nutrientes que suportam o crescimento da maioria de microrganismos não fastidiosos sem que seja dada uma vantagem no crescimento isolado de um microrganismo (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).
- Meios seletivos contêm agentes que inibem o crescimento de vários microrganismos exceto os que se pesquisa. Os agentes inibitórios são vários tais como corantes, sais biliares, álcoois, ácidos e antibióticos (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).
- Meios diferenciais apresentam fatores que permitem distinguir colônias de bactérias consoante as suas características metabólicas (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).

Meios de Cultura Líquidos

- **Caldo Tioglicolato**

O caldo de Tioglicolato é um meio de enriquecimento que contém nutrientes como caseína, extrato de levedura e de carne. Apresenta 0,075% de agar prevenindo que o oxigênio atmosférico seja transportado até à base do caldo. Com a adição de um agente redutor é criado um ambiente anaeróbico na base do tubo do caldo de Tioglicolato permitindo um crescimento de bactérias anaeróbicas. Sendo assim, o crescimento de bactérias gram-negativas e gram-positivas aeróbicas facultativas crescem ao longo do tubo e bactérias anaeróbicas estritas crescem no fundo do tubo (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).

- **Caldo Brain Heart Infusion – BHI**

O caldo BHI é um meio de enriquecimento para vários microrganismos, que inclui infusões de vários tecidos de animais, peptonas, tampão de fosfato e dextrose (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).

- **Caldo Schaedler**

É um meio não seletivo para recuperar bactérias anaeróbias e aeróbias e contém um agar com peptona e extrato de levedura com adição de hemina, L-cisteína e 5% de sangue para enriquecer o meio para o crescimento de anaeróbios (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).

- **Caldo Granada**

O caldo Granada permite a identificação presuntiva do *Streptococcus agalactiae*. Apresenta um pigmento alaranjado na sua presença, devido à ausência de hemólise, podendo assim ser visualmente confirmatório da presença de *Streptococcus agalactiae* (Rosa-Fraile, Manuel de la Camacho-Muñoz, 2005).

- **Caldo GN**

Meio seletivo para bactérias gram-negativas, utilizado para o isolamento de patógenos gastrointestinais, como *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* a partir de amostras de fezes. O caldo contém citrato de sódio e desoxicolato de sódio, um sal biliar que inibe bactérias gram-positivas e gram-negativas de crescimento rápido, bactérias gram-negativas comensais do trato gastrointestinal (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).

Meios de cultura sólidos

- **Gelose Chocolate PoliVitex – PVX**

É um meio nutritivo com presença de sangue hemolisado. Com esta hemólise são libertados nutrientes como hemoglobina, hemina ou fator X e NAD ou fator V. São estes fatores que permitem o crescimento de microrganismos fastidiosos, como por exemplo, *Neisseria gonorrhoeae* e *Haemophilus spp* (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).

- **Gelose CLED**

Gelose de CLED é um meio diferencial utilizado para a quantificação bacteriana na urina. Permite o crescimento de patógenos urinários e previne o *swarming* de *Proteus spp.* devido à deficiência de eletrólitos. A lactose permite diferenciar microrganismos fermentadores da lactose dos não-fermentadores. O azul de bromotimol é um indicador de pH que altera a cor do meio quando os microrganismos fermentadores diminuem o pH do meio, alterando de verde para amarelo (BioMérieux, 2003).

- **Gelose Sabouraud Gentamicina e Cloranfenicol - SGC**

É um meio de isolamento de fungos leveduriformes e filamentosos. A presença de Gentamicina e Cloranfenicol inibe o crescimento de bactérias gram-negativas e gram-positivas. A presença de um pH baixo auxilia na inibição do crescimento de bactérias (BioMérieux, 2003).

- **Coletos**

Meio de isolamento de micobactérias, mais enriquecido que o meio Lowenstein-Jensen devido à presença de gemas de ovo (BioMérieux, 2003).

- **Gelose Esculina**

Meio que permite diferenciar *Enterococcus spp.* e *Streptococcus bovis* de outros estreptococos. O *Enterococcus spp.* hidrolisa a esculina e glucose do meio. A reação da hidrólise cria a esculetina que irá reagir com o citrato férrico presente no meio formando um complexo negro (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).

- **Gelose Kligler**

A gelose de Kligler é utilizada para a diferenciação de bactérias do grupo *Enterobacteriaceae*, em características como fermentação da glucose e lactose, e liberação de sulfitos (BioMérieux, 2003).

- **Gelose Lowenstein-Jensen**

Meio de isolamento de micobactérias. A presença de glicerol e ovo fornece nutrientes necessários para o crescimento de micobactérias e a presença de verde malaquite juntamente com vários antibióticos inibem o crescimento de várias bactérias (BioMérieux, 2003).

- **Gelose Gardnerella**

Meio seletivo e diferencial para o isolamento de *Gardnerella vaginalis*. O meio contém colistina e ácido nalidixico inibindo o crescimento de bactérias gram negativas. É também suplementado com anfotericina B para reduzir o crescimento de leveduras que se encontram frequentemente na mucosa vaginal (BioMérieux, 2003).

- **Gelose Columbia + 5% sangue carneiro – COS**

O COS é um meio nutritivo para o isolamento de microrganismos fastidiosos e não fastidiosos. É constituído por peptonas, caseína e extrato de carne. O sangue de carneiro permite a deteção de reações hemolíticas (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).



Beta Hemolysis

Alpha Hemolysis

Gamma Hemolysis

Figura 12 - Tipos de hemólise presentes no meio de cultura gelose de sangue.

- **Gelose SS**

Meio seletivo e diferencial para o isolamento de microrganismos entéricos gram-negativos, como *Salmonella spp.* e *Shigella spp.*. A presença de sais biliares permite a inibição do crescimento de bactérias gram-positivas. A presença de lactose permite a diferenciação de bactérias fermentadoras de lactose, apresentando as colônias de vermelho. A presença de citrato férrico e de tiosulfato de sódio permite a detecção de bactérias produtoras de H_2S . Estas colônias apresentam um precipitado negro (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).

- **Gelose Hektoen – HKT**

É um meio seletivo que contém sais biliares e corantes como azul de bromotimol e fucsina ácida inibindo bactérias gram-negativas de crescimento rápido, permitindo o crescimento de *Salmonella spp.* e *Shigella spp.*, bactérias patogênicas do trato gastrointestinal. O meio é também diferencial, devido à presença de lactose que é fermentada pelas bactérias gram-negativas comensais, dando uma cor laranja às suas colônias. *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* não fermentam a lactose apresentando as suas colônias com as cores neutras do meio. Para as diferenciar, o meio contém citrato férrico para detetar a presença de H_2S para que apareça um precipitado negro nas colônias produtoras de H_2S , como a *Salmonella spp.* (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).

- **Gelose MacConkey – MCK**

A gelose MCK é diferencial e seletiva. O meio contém cristal de violeta que inibe o crescimento de bactérias gram-positivas e fungos. O indicador de pH, vermelho neutro

permite diferenciar bactérias que fermentam a lactose. Com a diminuição do pH do meio as colónias apresentam uma cor rosa (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).

- **Gelose Yersinia – CIN**

O meio CIN é seletivo e diferencial para o isolamento de *Yersinia enterocolitica*. A fermentação do manitol na presença do vermelho neutro, indicador de pH, resulta na formação de colónias com característica denominada “olho de boi”. A presença de cristal violeta, desoxicolato de sódio e novobiocina permitem a inibição do crescimento de bactérias gram negativas e gram positivas (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).

- **Gelose Mueller Hinton 2**

Este meio é utilizado para a determinação da suscetibilidade de bactérias a antibióticos pelo método de difusão em disco e tiras E-Test (BioMérieux, 2003).

- **Gelose Campyloset**

O meio Campyloset é um meio seletivo para o isolamento de *Campylobacter spp.* a partir de amostras de fezes. A seletividade é assegurada pelos antibióticos e antifúngicos presentes, inibindo a maioria das bactérias comensais do trato gastrointestinal (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).

- **Gelose SCS**

Meio nutritivo para isolamento de microrganismos anaeróbios, composto por peptonas e extrato de leveduras, com 5% de sangue, enriquecendo o meio para os microrganismos anaeróbios (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).

5.2 Colheita e Sementeira Primária de Produtos Biológicos

Apesar de todo o empenho dos técnicos de laboratório, do seu melhor conhecimento das técnicas de trabalho e do seu esforço, a qualidade da amostra que lhes é entregue é decisiva na qualidade do resultado obtido. É de notar que uma má amostra não pode conduzir a um bom resultado (Fonseca, 2001).

Existem vários critérios de rejeição de amostras tais como requisições incompletas ou mal preenchidas, produtos não identificados, acondicionamento em recipientes não estéreis e/ou mal fechados, tempo de transporte não respeitado, amostras contaminadas, como por

exemplo, urinas contaminadas com fezes e, por último, amostras impróprias como saliva em vez de expectoração, urina de 24 horas, pontas de cateter de Foley, tubos endotraqueais, entre outros (Fonseca, 2001).

Neste capítulo pretendo apresentar os vários tipos de amostras que dão entrada no serviço de Microbiologia, realçando a colheita e a sua sementeira (Fonseca, 2001).

Tabela 12 - Meios de cultura utilizados em cada tipo de amostra.

Amostra	Meios de Cultura
Urina	CLED
Fezes	MCK, SS, HK, GN e Campyloset
Expectorações	MCK, GS, GC
Lavados Brônquicos	Sabouraud (caso o doente seja HIV+)
Lavados Broncoalveolares	
Líquidos Ascíticos	MCK, GS, GC, Tioglicolato
Líquidos Pleural	
Líquido Cefalo Raquideo	GC, GC, BHI e prova de esterilidade ao BHI
Pús (Zaragatoa)	MCK, GS, GC
Pús Frascos e biópsias	MCK, GS, GC, Tioglicolato
Pús (Seringa)	MCK, GS, GC, Tioglicolato, Schaedler
Catéter	GS (semeada por rolamento)
Exsudado Cervico Vaginal Exsudado Uretral	GS, GC, Gardenerella, VCAT, Sabouraud

5.2.1 Urina

Num indivíduo saudável o trato urinário superior encontra-se isento de microrganismos. Em condições normais a urina na bexiga é estéril. No entanto, na porção distal da uretra, existe uma flora microbiana comensal que passa para a urina quando esta é excretada. Esta flora é constituída por bactérias Gram positivas como *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium sp.* podendo também existir *Neisseria sp.* e alguns membros de enterobactérias (Ferreira e Sousa, 1998).

No trato genital feminino adulto há uma flora normal mais complexa que varia ao longo do ciclo menstrual. O grupo principal pertence ao género *Lactobacillus sp.* sendo bactérias ácido-tolerantes que fermentam o glicogénio produzido pelo epitélio vaginal dando origem ao

ácido láctico. Como consequência, o pH vaginal baixa para valores entre 4,4 e 4,6 sendo reduzido o número de microrganismos que conseguem crescer neste ambiente, como por exemplo *Enterococcus sp.*, *Corinebacterium sp.* e leveduras (Ferreira e Sousa, 1998).

- Colheita

A colheita de urina deve ser efetuada com técnica adequada, de modo a evitar a contaminação da amostra com a flora saprófita da região. O doente deve lavar-se bem com água e sabão e posteriormente rejeitar o 1º jato, recolhendo o 2º jato representativo da flora da bexiga (Fonseca, 2001).

Nos doentes algaliados a colheita é feita diretamente do tubo da algália (Fonseca, 2001).

Em doentes com sintomatologia, 1 amostra é adequada ao diagnóstico. Em doentes assintomáticos podem ser necessárias 2 a 3 amostras (Fonseca, 2001).

Uma urina de 24 horas não é aceite para exame microbiológico, assim como mais de uma amostra em 24 horas (Fonseca, 2001).

As urinas podem ser colhidas em tubos que contêm ácido bórico. Assegura a qualidade da urina durante 72 horas sem refrigeração.

- Sementeira

As urinas são semeadas em meio CLED, homogeneizando a amostra, mergulha-se a ansa de 1µl na vertical e faz-se uma estria central no meio CLED com várias estrias perpendiculares à estria central, sendo um processo quantitativo, incubando a placa em meio aerobiose a 35°C durante 24 horas.

É fixada uma gota da urina em lâmina para uma visualização microscópica dos patogénicos através da coloração de Gram.

Tabela 13 - Avaliação quantitativa da amostra de urina em meio CLED.

Contagem	Conclusão
<10³ UFC/mL	Ausência de infeção urinária.
10³-10⁵ UFC/mL	Ausência de sintomatologia: Pedido de nova amostra, recontagem. Presença de sintomatologia: Envio da contagem de UFC e identificação bacteriana.
>10⁵ UFC/mL	Sugestivo de infeção urinária.

Se no meio de CLED há presença de mais de dois tipos de colônias, deve-se reportar como amostra contaminada, pedindo nova amostra.

5.2.2 Hemoculturas

Em muitas situações clínicas, a detecção de microrganismos no sangue do doente tem grande importância para o diagnóstico e para o prognóstico. Por vezes, o resultado de uma hemocultura é a única fonte imediata de conhecimento do agente etiológico de infecções graves, sendo que o diagnóstico e o tratamento do doente dependem dele. Em outros casos é um indicador da gravidade, da extensão e da disseminação de uma infecção (Fonseca, 2001).

- Colheita

O volume a colher pode variar, dependendo do estado do doente e do número de hemoculturas. No caso das crianças deve-se colher uma hemocultura de 1 a 3ml, já nos adultos podem ser colhidas até 5 hemoculturas de 8 a 10ml cada (Fonseca, 2001).

Os frascos de hemoculturas contêm resinas que permitem a inibição de antibióticos, possibilitando o crescimento de microrganismos. São enriquecidos com meio líquido de soja-caseína digerida para enriquecer o meio para o crescimento de microrganismos aeróbios, anaeróbios e fungos (Fonseca, 2001).

Após a colheita as hemoculturas são transportadas para o serviço de Microbiologia onde são colocadas num aparelho de incubação, o BACTEC 9240.

- Incubação

As hemoculturas são incubadas num equipamento, o BACTEC 9240 que monitoriza em tempo real através de um detetor de fluorescência, a concentração de CO₂ existente no frasco de hemocultura. Cada frasco apresenta na sua base um sensor de fluorescência de CO₂ que é monitorizado em intervalos de 10 minutos. Se a fluorescência aumentar ao longo do tempo significa que há consumo de O₂ por parte de microrganismos presentes nas hemoculturas. O BACTEC sinaliza a posição da hemocultura positiva para ser semeada (Schwabe *et al.*, 1995).

- Sementeira

As hemoculturas após incubação, caso haja crescimento de microrganismos, são semeadas em meios próprios dependendo do tipo de Hemocultura:

- Hemocultura aeróbia – COS agar.
- Hemocultura anaeróbia – COS agar e SCS agar.
- Hemocultura pediátrica – PVX agar ou COS agar.
- Hemocultura micológica – COS e Sabouraud agar.

Tabela 14 - Causas comuns de bacteriemia e funginemia (Vandepitte et al., 2003).

Microrganismos Gram-negativos	Microrganismos Gram-positivos
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Klebsiella spp.</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Enterobacter spp.</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Proteus spp.</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> (grupo D)
<i>Salmonella typhi</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i> (grupo A)
<i>Salmonella spp.</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> (grupo B)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Peptostreptococcus spp.</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	
<i>Brucella spp.</i>	
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	

5.2.3 Líquido Cefalorraquidiano

Líquido normalmente estéril que caso se suspeite de meningite permite ajudar no diagnóstico do microrganismo patogénico. As bactérias mais comuns responsáveis pela meningite são a *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* tipo b.

A observação do gram no LCR é importante no diagnóstico da meningite e deve ser logo realizado após a receção da amostra.

A sementeira é realizada em gota, em gelose de chocolate, gelose de sangue, em caldo de enriquecimento BHI e incubada a 35°C com 5 a 10% de CO₂. É também feito no laboratório, a pesquisa de antígenos solúveis bacterianos.

Tabela 15 - Exemplos de microrganismos que causam meningite (Vandepitte et al., 2003).

Microrganismos
Neonatais (até os 2 meses)
<i>Escherichia coli</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Salmonella spp.</i> <i>Citrobacter spp.</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> (grupo B)
Crianças e Adultos
<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Staphylococcus spp.</i>

- Colheita

A amostra é colhida por punção lombar e deve ter um volume entre 5 a 10mL sendo realizada por um médico. A área da punção é desinfetada previamente. A amostra é separada em três tubos estéreis, num tubo são feitos exames citológicos, bioquímicos, e, por último são realizados exames microbiológicos. A amostra deve ser enviada e processada o mais rápido possível, devido à desintegração das células, qualquer atraso provoca uma contagem celular errônea que não reflete a situação clínica do paciente (Vandepitte et al., 2003).

- Sementeira

O LCR deve ser analisado macroscopicamente com o registo da presença ou ausência de vários aspetos: Turbidez, purulência, cor, presença de sangue ou de fibrina.

Como indicado anteriormente, o LCR é semeado em meios de cultura como GC, GS e BHI. No meio de gelose de sangue é possível encontrar colónias de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, entre as quais *Streptococcus agalactiae*, que produz β-hemólise, e *Streptococcus pneumoniae* que produz α-hemólise.

O meio de gelose de chocolate permite o crescimento de colónias de *Haemophilus influenzae*, e visto ser um meio PVX, já contém os fatores de crescimento necessários para que esta bactéria se desenvolva no meio.

Caso o médico suspeite de micobactérias é necessário inocular a amostra no meio Coletsos.

5.2.4 Exsudados purulentos, feridas ou abscessos

O número de agentes responsáveis por infeções da pele e dos tecidos moles é muito elevado. Deve ser tomada especial atenção à necessidade de usar meio de transporte adequado de modo a evitar a distorção quantitativa dos microrganismos existentes no local infetado e à técnica de colheita pois a possibilidade de contaminação da amostra com flora comensal da pele é enorme (Fonseca, 2001).

- Colheita

É preferível obter a amostra por aspiração, biópsia ou raspagem do que por zaragatoa, muitas vezes a quantidade da amostra que é possível colher é muito pequena (Fonseca, 2001).

Os exsudados purulentos podem ser colhidos a partir de vários processos infecciosos como lesões superficiais, úlceras, queimaduras, lesões profundas (abcesso fechado e lesão fistulada) e lesões do tipo “rash” (Fonseca, 2001).

Num processo fechado, deve-se desinfetar a pele e puncionar através de uma agulha esterilizada e aspirar o produto, expulsando o ar. Só caso não seja possível fazer a colheita por aspiração deve-se colher por zaragatoa (Fonseca, 2001).

Num processo aberto, infeção superficial, deve-se lavar o local com detergente suave, retirando o excesso com soro fisiológico e realizar o procedimento de aspiração semelhante ao processo fechado (Fonseca, 2001).

- Sementeira

Os exsudados são inoculados em gelose de chocolate, gelose de sangue e MacConkey agar, estriando as placas em 3 a 5 quadrantes com uma ansa esterilizada. Adicionalmente inocula-se num meio líquido, meio de tioglicolato com 1 a 2 gotas da amostra, para pesquisa de microrganismos fastidiosos.

As placas de gelose de sangue e chocolate são incubadas a 35°C, em atmosfera com 5 a 10% de CO₂. A placa de MacConkey agar e o caldo de tioglicolato são incubados a 35°C em aerobiose.

5.2.5 Fezes

Infeções entéricas bacterianas que causam disenteria, diarreia e febre são problemas comuns mundiais. As crianças são o alvo frequente deste tipo de infecção por múltiplos microrganismos patogénicos. O número de pessoas infetadas tem vindo a aumentar devido à prevalência de imunodeprimidos (Vandepitte *et al.*, 2003).

As bactérias mais comuns responsáveis pela infecção entérica são *Salmonella sp*, *Shigella sp.*, *Campylobacter sp.* e *Yersinia enterocolítica*.

São vários os mecanismos patogénicos destes agentes:

- Produção de toxinas que afectam a secreção de fluídos, função celular, função neurológica. (Ex. *Clostridium sp.*)

- Crescimento dentro das células da mucosa do intestino, danificando as células. (Ex. rotavirus e adenovírus)

- Por invasão da mucosa do intestino. (Ex. *Shigella dysenteriae*)

- Por invasão sistémica. (Ex. *Salmonella sp.*)

- Por adesão à mucosa intestinal, alterando as funções de absorção e secreção. (Ex. *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium sp.*)

- Colheita

A amostra de fezes deve ser colhida numa embalagem estéril e deve ser enviada no prazo de uma hora. As amostras de fezes devem ter um tamanho aproximado de uma noz ou colhidas em zaragatoas rectais, isto porque amostras de grandes quantidades são impróprias para o processamento laboratorial visto que as bactérias da flora intestinal crescem rapidamente podendo eliminar a presença de bactérias patogénicas.

As amostras devem estar isentas de contaminação urinária.

Em casos de amostras de fezes para exame a fresco, pesquisa de toxinas, deteção de parasitas e técnicas de aglutinação em látex, devem ser enviadas sem adição de conservantes.

As amostras primárias podem ser refrigeradas até 3 horas, há exceção de pesquisa de microrganismos termosensíveis, sem qualquer perda apreciável de microrganismos patogénicos.

- Sementeira

A sementeira primária é realizada em meios seletivos e diferenciais – meio de MacConkey, meio de Hektoen e meio de SS. Com uma ansa inocula-se a amostra para um caldo de Gram negativos, o caldo GN, permitindo uma maior seletividade devido a contribuir para o crescimento de *Shigella sp.* e *Salmonella sp.*.

Em casos mais raros é pedido pelo médico a pesquisa de *Yersinia enterocolítica* e *Campylobacter spp.*.

Nestas situações são utilizados meios específicos para cada uma das bactérias.

No caso da *Yersinia enterocolítica*, o meio utilizado é o meio Yersinia que contém antibióticos que inibem o crescimento de qualquer outro patogénico entérico. As suas colónias apresentam-se com centro vermelho e margem transparente devido à presença de manitol, fermentado pela *Yersinia enterocolítica*. A sua incubação é feita a uma temperatura de 25°C a 32°C.

Para o isolamento de *Campylobacter sp.* é utilizado o meio Campyloset, um meio seletivo que utiliza antibióticos e antifúngicos inibindo qualquer crescimento de outros contaminantes. A incubação deste meio é feita em ambiente microaerofílico a uma temperatura de 42°C.

As suas colónias apresentam-se no meio com tamanho pequeno e cinzento.

5.2.6 Trato Respiratório Superior

O trato respiratório superior pode sofrer vários tipos de infecção como faringites, nasofaringites, otites médias, sinusites e epiglotites (Vandepitte *et al.*, 2003).

De todas estas infeções, a faringite é a mais frequente. A maioria dos casos provém de uma etiologia vírica (Vandepitte *et al.*, 2003).

O diagnóstico de faringite bacteriológica é complicado devido à existência de uma flora complexa de bactérias aeróbias e anaeróbias na orofaringe. O microbiologista tem o papel de distinguir quais são as bactérias comensais e as bactérias patogénicas (Vandepitte *et al.*, 2003).

- Colheita

A colheita é realizada com a utilização de uma zaragatoa estéril. O médico tem de ter atenção para que não haja contacto entre a zaragatoa e a área superficial da boca e língua. Recolhe-se assim uma amostra da área inflamada, como amígdalas e orofaringe (Vandepitte *et al.*, 2003).

A zaragatoa é transportada para o laboratório num meio de transporte, o meio Amies (Vandepitte *et al.*, 2003).

- Sementeira

Os meios utilizados para diagnóstico de infeções do trato respiratório superior são GS, GC e MCK.

Os microrganismos mais comuns de se apresentarem como patogénicos são bactérias Gram-positivas, principalmente *Streptococcus spp.* Outro microrganismo que causa complicações a imunodeprimidos é o *Staphylococcus aureus*.

Pacientes malnutridos, imunodeprimidos ou com idade avançada tendem a ser colonizados por enterobacteriáceas como *Escherichia coli*, e por bactérias Gram-negativas não fermentadoras, como *Pseudomonas spp.* O meio de MCK permite isolar estas bactérias gram-negativas.

O meio de gelose de sangue permite diferenciar através da hemólise os vários grupos de *Streptococcus spp* e ainda permite o crescimento de *Staphylococcus aureus*.

O meio de gelose de chocolate permite que haja nutrientes para o crescimento de *Neisseria meningitidis*, uma bactéria gram-negativa fastidiosa que se encontra presente em complicações como faringites (Vandepitte *et al.*, 2003).

5.2.7 Trato Respiratório Inferior

As infeções do trato respiratório inferior ocorrem abaixo da laringe, envolvendo a traqueia, brônquios ou tecido pulmonar. Em situações de pneumonia, há ocorrência de pleurisia, diminuição da elasticidade pulmonar, e, por vezes, produção de fluido na cavidade pleural (Vandepitte *et al.*, 2003).

Uma das infeções mais graves no trato respiratório inferior é a tuberculose pulmonar. A transmissão através de aerossóis com presença de *Mycobacterium tuberculosis* torna numa doença de contágio facilitado (Vandepitte *et al.*, 2003).

Tabela 16 - Infecções mais comuns do trato respiratório inferior (Vandepitte et al., 2003).

Infeções	Microrganismos
Bronquite aguda e crónica	<i>Haemophilus influenzae</i> ; <i>Streptococcus pneumoniae</i> ; <i>Moraxella catarrhalis</i> .
Abcesso pulmonar	<i>Peptostreptococcus spp.</i>
Pneumonia e Broncopneumonia	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Escherichia coli</i> .
Tuberculose pulmonar	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> .

- Colheita

A colheita deve ser feita por expetoração. É necessário que a secreção esteja livre de saliva ou bactérias presentes na flora da boca. Caso o doente não consiga expetorar recorre-se a um aparelho de sucção, apenas um médico pode realizar este procedimento.

As amostras são constituídas por secreções brônquicas, lavados brônquicos e lavados broncoalveolares.

- Sementeira

Com uma ansa esterilizada é recolhida uma porção da amostra purulenta e inocula-se em gelose de sangue, gelose de chocolate e MacConkey.

5.2.8 Exsudado Cervico Vaginal

A flora vaginal de uma mulher, pré-menopausa, consiste predominantemente em *Lactobacillus spp.* e numa variedade de bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas (Vandepitte et al., 2003).

Tabela 17 - Microrganismos que provocam infeções vaginais (Vandepitte et al., 2003).

Infeção	Causa/Microrganismos
Vaginite	<i>Gardnerella vaginalis</i> ; <i>Candida albicans</i>
Vaginose bacteriana	Aumento de crescimento de anaeróbios ou presença de <i>Mobiluncus sp.</i>
Cervicite	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ; <i>Chlamydia trachomatis</i>
Complicações na gravidez	<i>Streptococcus agalactiae</i>

- Colheita

O procedimento é realizado pelo médico. A amostra deve ser retirada através de uma zaragatoa com o auxílio de um espéculo, tendo o cuidado de eliminar o muco cervical para não haver contaminação da amostra.

A zaragatoa deve ser transportada em meio de Amies.

- Sementeira

O exsudado cervico vaginal é semeado em meio de gelose de sangue, gelose de chocolate, sabouraud, VCAT e Gardnerella.

O meio VCAT é um meio seletivo para o isolamento de *Neisseria gonorrhoeae*. Apresenta nos seus constituintes vancomicina, colistina, anfotericina e trimetropim. A vancomicina e a colistina permitem inibir microrganismos contaminantes de grande variedade que não apresentam importância clínica. O trimetropim permite reduzir *swarming* do *Proteus* sp. e a anfotericina inibe leveduras. A *Neisseria gonorrhoeae* apresenta-se com colónias cinzentas.

O meio Gardnerella é um meio seletivo para o isolamento de *Gardnerella vaginalis*. Contém colistina e ácido nalidíxico que inibem bactérias Gram negativas. Para reduzir a presença de leveduras é utilizada anfotericina B. O meio também apresenta sangue para a deteção de hemólise. A *Gardnerella vaginalis* apresenta colónias brancas pequenas rodeada por uma β -hemólise. A sua incubação é feita a 36°C com 2% de CO₂ durante 48 a 72 horas.

O meio Granada possibilita uma identificação rápida de *Streptococcus agalactiae*, causador de infeções urinárias, infeções intra-amnióticas e bacteriémia na altura do parto. A sua incubação é feita a 36°C durante 24 a 48 horas.

5.2.9 Pontas de Cateter

Por vezes os cateteres intravenosos são a causa de septicémia devido a uma fraca desinfeção da área da pele que entra em contacto com o cateter. A bactéria comensal da pele que se identifica nestes casos frequentemente é o *Staphylococcus epidermidis*.

- Colheita

O cateter deve ser enviado para o laboratório em frasco estéril dividido em três partes (proximal, médio, distal).

- Sementeira

Para a realização da sementeira do cateter é necessário a utilização de material estéril, como uma pinça, que permita realizar a técnica de Maki, uma técnica de rolamento do cateter sobre a placa de gelose de sangue, cobrindo a área da placa por completo.

A incubação é feita a 35°C com 5 a 10% de CO₂ durante 72 horas. A cultura é considerada positiva sempre que o número de colónias é maior ou igual a 15.

5.3 Observação Microscópica – Aspeto Morfológico

5.3.1 Coloração de Gram

A morfologia do agente isolado permite na maioria dos casos, orientar os passos seguintes da identificação microbiológica. No caso das bactérias a coloração de Gram assume grande interesse para o diagnóstico (Ferreira e Sousa, 1998).

Na secção de Microbiologia, as lâminas são coradas através de um aparelho automático, o Previ-color Gram.

A coloração de Gram permite classificar e diferenciar os microrganismos através do seu tamanho, forma e arranjo celular. A reação de coloração é dependente da parede celular do microrganismo. A presença de uma camada grossa de peptidoglicanos e ácido teicóico existentes nos microrganismos Gram positivos levam a uma resistência à descoloração pelo álcool. Retêm o corante primário, o cristal violeta, e apresentam-se roxas. A parede celular dos microrganismos Gram negativos, constituída por lipopolissacarídeos é destruída pelo álcool e o cristal violeta é libertado. O corante secundário, a Safranina, é absorvida e cora os microrganismos gram-negativos de rosa (Maza, Pezzlo e Baron, 1997).

A morfologia das bactérias é descrita geralmente como cocos, bacilos ou cocobacilos e os seus agrupamentos variam consoante a sua morfologia como diplococos, estafilococos, diplobacilos, estreptobacilos, cocobacilos, entre outros (Maza, Pezzlo e Baron, 1997).

5.3.2 Auramina

A fixação de uma lâmina corada com auramina tem como objetivo visualizar a presença de micobactérias. Um corante fluorescente é utilizado para se ligar ao ácido micólico da parede

celular das micobactérias. Após esta ligação as micobactérias emitem uma cor amarela fluorescente. Para que haja um maior contraste, adiciona-se permanganato de potássio, um corante que torna todo o fundo negro. Permite assim detetar rapidamente a presença de micobactéria numa lâmina utilizando uma objetiva inferior, x25, que das restantes colorações, x100 com óleo de imersão (Maza, Pezzlo e Baron, 1997).

5.3.3 Kinyoun

A coloração Kinyoun utiliza a fucsina como corante que fixa ao ácido micólico da parede celular das micobactérias, a qual não é removida pelo álcool. Como contraste é utilizado o azul de metileno. Assim sendo, os bacilos ácido-álcool resistentes coram de vermelho e o fundo fica azul (Maza, Pezzlo e Baron, 1997).

5.4 Testes Bioquímicos

Os testes bioquímicos são utilizados como auxílio ao microbiologista após o exame cultural.

Cocos Gram Positivos

5.4.1 Prova da Catalase

Na rotina laboratorial, a prova da catalase permite diferenciar entre os grupos *Staphylococcus spp.*, catalase positiva, e os grupos *Streptococcus spp.* e *Enterococcus spp.*, ambos catalase negativa.

O teste consiste na pesquisa da presença de catalase, uma enzima que catalisa o peróxido de hidrogénio em oxigénio e água. O procedimento é simples, com uma gota de peróxido de hidrogénio numa lâmina de vidro, é adicionado uma colónia suspeita de pertencer aos grupos descritos anteriormente. Caso haja libertação de bolhas de ar significa que a enzima se encontra presente.

5.4.2 Prova da Coagulase

A prova da coagulase permite diferenciar *Staphylococcus aureus* de outros *Staphylococcus spp.*

O PASTOREX™ STAPH-PLUS, é um teste de aglutinação rápido que permite detetar em simultâneo o fator de afinidade de fibrinogénio também conhecido como “clumping factor”, proteína A que possui afinidade às imunoglobulinas IgG e, por último, deteta os polissacarídeos da membrana celular do *Staphylococcus aureus*.

O reagente é feito de partículas de latex que permite uma aglutinação eficaz na presença de *Staphylococcus aureus*.

5.4.3 Testes presuntivos de estreptococos

Os testes presuntivos de estreptococos são utilizados após a visualização da hemólise na gelose de sangue.

Tabela 18 - Teste presuntivo após visualização da hemólise.

Hemólise	Teste presuntivo a realizar
α -hemólise	Optoquina
β -hemólise	Identificação do grupo por serologia.
γ -hemólise	Bile-esculina

5.4.4 Teste da Optoquina

O teste da optoquina permite diferenciar *Streptococcus pneumoniae* de outros estreptococos α -hemolíticos. O procedimento é realizado através da recolha de duas a três colónias isoladas com uma ansa de 10 μ L estéril para o meio de gelose de sangue, fazendo um espalhamento por toalha, inserindo o disco de optoquina no centro da placa.

Caso haja um halo de sensibilidade ao antibiótico acima de 14mm de diâmetro indica que pode estar presente *Streptococcus pneumoniae*.

5.4.5 Identificação do grupo de Lancefield

Os estreptococos β -hemolíticos possuem antígenos específicos que identificam o grupo a partir de anti-soros (Teixeira *et al.*, 2011).

Para tal é utilizado o SLIDEX Strepto Plus, um teste de aglutinação de partículas de latex que permite agrupar os estreptococos em A,B,C,D,F e G segundo a classificação de Lancefield.

Após a cultura, são colhidas colónias isoladas para um tubo que contém o reagente de extração. O antígeno específico do grupo que se encontra na parede é extraído por uma enzima. O antígeno extraído é identificado por partículas de látex sensibilizadas por um anticorpo específico. Se o antígeno estiver presente ocorrerá aglutinação determinando o grupo correspondente ao microrganismo.

5.4.6 Meio Bile-esculina

O meio Bile-Esculina permite diferenciar enterococos de estreptococos do grupo D de Lancefield. O meio é seletivo devido à presença de sais biliares, e diferencial devido à esculina. Tanto os *Enterococcus spp.* como os estreptococos do grupo D, crescem na presença de sais biliares mas apenas *Enterococcus sp.* hidrolisa a esculina. Os produtos da hidrólise da esculina reagem com o citrato de ferro presente no agar tornando o meio escuro (Lindell e Quinn, 1975).

Bacilos e Cocos Gram Negativos

5.4.7 Teste da Oxidase

O teste da oxidase permite identificar bactérias que produzem oxidase, uma enzima presente na cadeia transportadora de eletrões. É determinada através de um disco banhado com tetrametil p-fenilenodiamina. Caso esteja presente, ocorrerá uma reação colorimétrica passando o disco de uma cor azul escura para rosa.

Tabela 19 - Diferenciação entre bacilos e cocos Gram negativos a partir do teste de oxidase.

Oxidase	Positiva	Negativa
Bacilos Gram Negativo	<i>Pseudomonas</i> spp.; <i>Acinetobacter</i> spp.	Enterobacteriáceas
Cocos Gram Negativo	<i>Neisseria</i> spp.	<i>Haemophilus</i> spp. (cocobacilos)

5.4.8 Prova dos Factores para identificação de *Haemophilus* spp.

Haemophilus spp. têm requisitos diferentes para o seu crescimento, podendo necessitar dos fatores de crescimento X ou V ou ambos. Isto permite diferenciar os *Haemophilus* spp. pela necessidade dos fatores.

Cada fator é apresentado em disco. O disco de fator X está impregnado com hemina enquanto o fator V está impregnado com NAD. Por sua vez, o disco de fator XV está impregnado com os dois compostos descritos anteriormente.

O procedimento é realizado a partir de uma suspensão equivalente a 0,5 McFarland de colónias isoladas suspeitas. Com uma zaragatoa faz-se uma inoculação de um meio Mueller-Hinton, meio nutritivo, em toalha, adicionando os discos para que haja possibilidade de medir os halos de sensibilidade.

O meio é incubado a 35°C a 5% de CO₂ durante 18 a 48 horas.

Tabela 20 - Interpretação dos resultados na indentificação de *Haemophilus* spp. através de fatores de crescimento.

<i>Haemophilus</i> spp.	Crescimento à volta dos discos		
	X	V	XV
<i>Haemophilus aegyptius</i>	-	-	+
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	-	-	+
<i>Haemophilus ducreyi</i>	+	-	+
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	-	-	+
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	-	+
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	-	+	+
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	-	-	+

5.5 Métodos de identificação e susceptibilidade

- Sistemas automatizados

5.5.1 VITEK ATB EXPRESSION

O VITEK é um equipamento que permite realizar a identificação e sensibilidade de uma bactéria a partir de galerias de identificação e galerias de sensibilidade.

As cartas de identificação apresentam cerca de 10 a 32 microtubos que contém um meio desidratado correspondente a um teste bioquímico. A reação produzida durante a incubação resulta numa alteração de cor ou turvação. As reações podem ser lidas pelo densitómetro ótico ou por introdução manual do perfil da carta.

As cartas de sensibilidade consistem em 16 a 32 cúpulas com antibiótico desidratado, podendo conter várias concentrações do mesmo antibiótico. O densitómetro ótico analisa a turvação de cada cúpula apresentando os resultados como sensível, intermédio ou resistente.

Tabela 21 - Cartas de Identificação.

ID32 C: Carta de identificação de fungos leveduriformes
ID32 GN: Carta de identificação de bactérias Gram negativas
ID32 STAPH: Carta de identificação de estafilococos
ID32 A: Carta de identificação de bactérias anaeróbias
API20 STREP: Carta de identificação de estreptococos
API NH: Carta de identificação de <i>Neisseria spp.</i> e <i>Haemophilus spp.</i>
API CORINE: Carta de identificação de <i>Corynebacterium spp.</i>
API CAMPY: Carta de identificação de <i>Campylobacter spp.</i>
API LISTERIA: Carta de identificação de <i>Listeria spp.</i>

Tabela 22 - Cartas de Sensibilidade.

ATB FUNGUS: Carta de sensibilidade para fungos leveduriformes
ATB PSE: Carta de sensibilidade para <i>Pseudomonas spp.</i>
ATB UR: Carta de sensibilidade para Enterobacteriáceas de origem urinária
ATB G-: Carta de sensibilidade para bactérias Gram negativas
ATB STREP: Carta de sensibilidade para estreptococos
ATB STAPH: Carta de sensibilidade para estafilococos
ATB ANA: Carta de sensibilidade para bactérias anaeróbias
ATB HAEMO: Carta de sensibilidade para <i>Haemophilus spp.</i>

5.5.2 BD PHOENIX 100

O BD PHOENIX 100 é um equipamento automatizado que permite uma rápida identificação e determinação quantitativa da suscetibilidade através da concentração mínima inibitória.

O equipamento permite realizar cerca de cem identificações e testes de suscetibilidade num ciclo de análise através de painéis combinados de ID/AST. A ID contém substratos desidratados para identificação bacteriana e a AST apresenta agentes antimicrobianos com diferentes concentrações. O BD PHOENIX 100 utiliza um indicador de colorimetria otimizada para AST e uma variedade de indicadores colorimétricos e fluorimétricos para o ID. Os painéis são inoculados através de uma suspensão standardizada de um inóculo e incubados a 35°C. Os painéis são analisados pelo equipamento de 20 em 20 minutos durante a sua incubação até um máximo de 16 horas.

5.6 Método de suscetibilidade manual

5.6.1 Método de Kirby-Bauer

O método de Kirby-Bauer é um teste de suscetibilidade por difusão em disco que determina a sensibilidade ou resistência de um determinado microrganismo a antibióticos.

O método é processado através de uma suspensão de uma ou mais colónias isoladas em solução de NaCl 0,45% a uma densidade de 0,5 McFarland. É inoculada em Mueller Hinton por sementeira em toalha e são colocados os respetivos discos impregnados com antibiótico. A presença de um halo determina, através de valores de referência da CLSI, a sensibilidade à concentração de antibiótico libertado no meio pelo disco.

5.6.2 Método E-Test

A tira E-Test apresenta um gradiente de concentração predefinido para cada antibiótico, determinando com precisão a concentração mínima inibitória. Quando a tira é colocada no meio de seleção, como por exemplo Mueller Hinton, o antibiótico impregnado na tira é transferido para a matriz do meio, criando um gradiente. O crescimento bacteriano é visível após incubação e uma elipse de sensibilidade é apresentada com a tira no centro. É possível determinar o valor CMI registando o valor $\mu\text{g/mL}$ apresentado na tira, onde a elipse intercepta a tira.

5.7 Micobactérias

As micobactérias pertencem à família *Mycobacteriaceae* e género *Mycobacterium*.

São bactérias aeróbias, imóveis, não capsuladas e não formadoras de esporos, apresentando uma estrutura bacilar ou cocobacilar. A sua parede celular é rica em lípidos e ácidos micólicos o que confere características específicas, tornando-as bactérias ácido-álcool resistentes (Ferreira e Sousa, 1998).

As duas micobactérias patogénicas ao Homem que causam mais complicações denominam-se de *Mycobacterium tuberculosis*, ou bacilo de Koch, agente da tuberculose; e *Mycobacterium leprae*, também designado por bacilo de Hansen, agente da lepra (Ferreira e Sousa, 1998).

O material biológico varia embora o mais comum sejam amostras respiratórias e líquidos pleurais. Contudo pode incluir-se material biológico como LCR, sangue, urina, etc. (Ferreira e Sousa, 1998).

Na secção de Microbiologia é utilizada uma sala diferenciada da sala comum, permitindo uma segurança adequada, evitando que haja contaminações. Na sala encontra-se uma câmara de fluxo de nível 2, na qual são feitos todos os processos de isolamento das micobactérias.

Para que ocorra um bom isolamento das micobactérias é necessário eliminar, das amostras, bactérias provenientes da flora normal do organismo, devido ao seu rápido crescimento.

O tratamento da amostra biológica inclui homogeneização, descontaminação e concentração. A descontaminação, como indicado anteriormente, serve para eliminar bactérias que possam estar presentes na amostra a analisar impedindo o crescimento das micobactérias (Ferreira e Sousa, 1998). Para a descontaminação é utilizado o BBL MycoPrep, um kit que adiciona à amostra hidróxido de sódio, agente mucolítico, e N-acetil-L-cisteína (NALC) que é também um agente mucolítico mas auxilia na descontaminação da amostra. A adição dos dois agentes torna a descontaminação mais eficaz e menos tóxica para as micobactérias (Vandepitte *et al.*, 2003). Após a descontaminação adiciona-se tampão de fosfato para eliminar a atividade dos dois agentes mucolíticos. O tampão lava a amostra e neutraliza o pH.

A amostra encontra-se preparada para ser centrifugada e concentrar as micobactérias. Após decantação do sobrenadante é fixada a uma lâmina e inocula-se a amostra descontaminada em meio MGIT e Lowenstein-Jensen.

Os tubos com meio Lowenstein-Jensen devem ser incubados por 2 a 3 dias a 35°C, inclinados numa posição horizontal para que a inoculação da amostra ocorra em todo o meio. A partir daí os tubos devem ficar a incubar a uma temperatura de 37°C durante 8 semanas, sendo inspecionados semanalmente para observar crescimento.

O MGIT é um tubo indicador de crescimento de micobactérias, suplementado com caldo Middlebrook modificado, que utiliza sistemas como BACTEC MGIT para detetar a presença de contaminantes.

O MGIT contém no fundo do tubo um composto fluorescente que é sensível à presença de oxigénio dissolvido no caldo. Inicialmente a grande quantidade de oxigénio dissolvido no tubo anula as emissões provenientes do composto sendo apenas detetada uma pequena quantidade de fluorescência. A respiração ativa dos microrganismos consome o oxigénio e permite que a fluorescência seja detetada. Os tubos introduzidos no sistema BACTEC MGIT são incubados a 37°C e monitorizados, a cada 60 minutos, relativamente ao aumento de fluorescência e respetivo consumo de oxigénio. Os frascos de cultura que não apresentem um aumento do consumo de oxigénio, ao longo de 6 semanas, são retirados do sistema BACTEC MGIT como sendo negativos.

Geralmente, a presença de colónias com aparência de “flocos de neve” após duas semanas de incubação transmite confiança de que se trata de uma positividade. Por vezes, na primeira semana o MGIT pode ser encontrado turvo, o que indica uma possível contaminação de outra bactéria indesejada, sendo necessária uma segunda descontaminação.

Sempre que existir crescimento no tubo de Lowenstein-Jensen e MGIT é realizada uma lâmina corada pela técnica de Kinyoun. Nos exames diretos positivos, corados por auramina, são confirmados também pela técnica de Kinyoun.

5.8 Micologia

Os fungos são de momento relevantes para o diagnóstico de muitas infeções. São a causa mais comum de infeções em imunodeprimidos, agindo como patogéneos oportunistas (Forbes, Sahm e Weissfeld, 1998). A infeção pode ocorrer através de inalação de esporos ou por contacto com uma lesão traumática (Forbes, Sahm e Weissfeld, 1998).

Os fungos podem ser separados em dois grandes grupos, as leveduras e os filamentosos. As leveduras apresentam colónias cremosas e opacas enquanto os fungos filamentosos apresentam colónias que comumente se designam de bolores, colónias esporuladas que se assemelham a algodão (Forbes, Sahm e Weissfeld, 1998).

- Sementeira

Como meio seletivo é selecionado o meio de SGC, que incuba em aerobiose a 30°C ou temperatura ambiente durante 1 a 5 dias, à exceção de produtos de pele, incluindo unhas e cabelos, que são incubados durante 30 dias.

- Fungos Leveduriformes

Para a identificação de fungos leveduriformes é realizado um teste clássico, a prova da filamentação ou prova da blastése.

Consiste em retirar uma colónia isolada do meio de SGC e suspendê-la com cerca de 0,5 mL de plasma. Após incubação de 3 horas a 37°C é realizado um exame microscópico a fresco registando se há presença de pseudohifas. Caso haja presença de pseudohifas, é validada a identificação como *Candida albicans*. Se o resultado é negativo, realiza-se a identificação a partir do equipamento Vitek ATB System Expression, com a carta de identificação ID32 C para pesquisa de fungos leveduriformes.

Após identificação é feito o teste de suscetibilidade a antifúngicos a partir de ATB Fungus, uma carta de sensibilidade que pode ser lida por Vitek ATB System Expression.

- FUNGITEST

O teste de suscetibilidade a antifúngicos também pode ser feito a partir de um FUNGITEST, um teste que apresenta 6 antifúngicos em duas concentrações diferentes. O crescimento é avaliado a partir de um indicador de cor. Caso haja crescimento num dos antifúngicos, a cor do meio é alterada de azul para rosa. Caso não haja crescimento o meio mantém-se azul.

O inóculo é preparado através de colónias isoladas numa suspensão de água destilada estéril, com uma densidade de 1 McFarland, a qual sofre uma diluição de 1:10. Dessa diluição é inoculado 20µL para uma suspensão com meio específico para o teste. A partir desta suspensão distribui-se em cada poço 100µL. O tempo de incubação é de 37°C durante 48 horas, à exceção de *Cryptococcus neoformans* em que a incubação é feita 32°C durante 72 horas.

- Fungos Filamentosos

Nos fungos filamentosos faz-se um registo do aspeto macroscópico das colónias no qual se verifica a pigmentação produzida no meio, tanto na frente da placa como no verso, e o aspeto macroscópico das hifas e o seu tempo de crescimento.

No registo microscópico é avaliada a septação das hifas, presença de corpos de frutificação e morfologia dos esporos.

- Técnica da Fita-Cola

Esta técnica permite visualizar as estruturas dos fungos filamentosos ao microscópico sem que haja destruição dessas estruturas.

O processo desta técnica resume-se a colocar um pedaço de fita-cola em contacto com o micélio, entre a parte mais nova e a parte mais velha do fungo, entre a periferia e o centro da cultura, respetivamente. Após o contacto, a fita-cola é colocada numa lâmina adicionando azul de lactofenol e uma lamela e encontra-se apta para a visualização das estruturas dos fungos filamentosos.

5.9 Parasitologia

A luta contra as parasitoses tem sido um sucesso nos países desenvolvidos devido à implementação de medidas sanitárias pessoais e comunitárias, tais como tratamento de águas, melhor processamento de alimentos e campanhas de higiene pessoal (Ferreira e Sousa, 2002).

A facilidade de deslocamentos das pessoas a grandes distâncias tornou mais vulgar o aparecimento de qualquer tipo de parasitose em regiões geográficas não endémicas. É frequente em Portugal o aparecimento de parasitoses cuja transmissão clássica está confinada a países tropicais, como a schistosomose e a malária (Ferreira e Sousa, 2002).

As parasitoses mais frequentes no nosso país são causadas por parasitas intestinais, como nemátodes intestinais e *Giardia lamblia*. O quisto hidático é também frequente no centro e sul do país (Ferreira e Sousa, 2002).

A Toxoplasmose e a infeção por *Cryptosporidium*, viram o número de casos aumentar nos últimos anos em função do aumento do número de doentes imunodeprimidos (Ferreira e Sousa, 2002).

- Malária

A malária é uma doença parasitária do Homem, causada por protozoários do género *Plasmodium*, parasitas intracelulares afetando particularmente os eritrócitos e transmitidos pela picada da fêmea do mosquito do género *Anopheles* (Ferreira e Sousa, 2002).

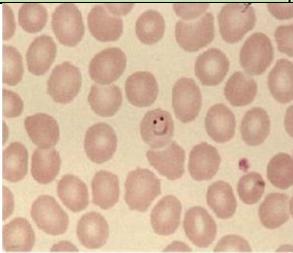
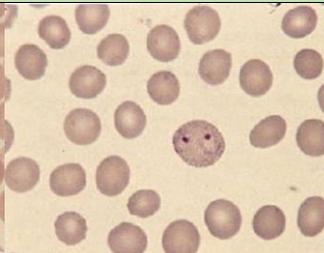
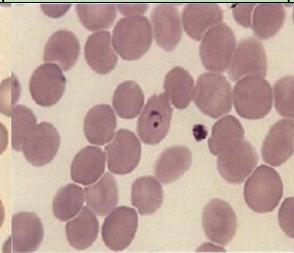
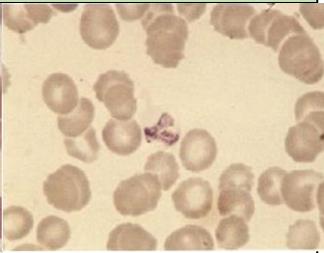
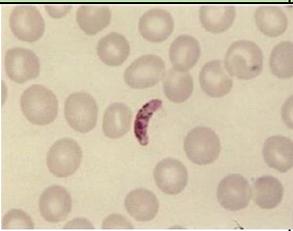
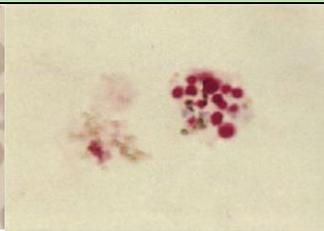
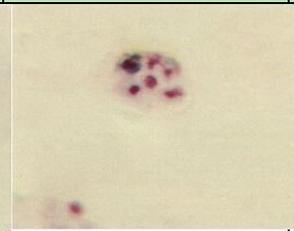
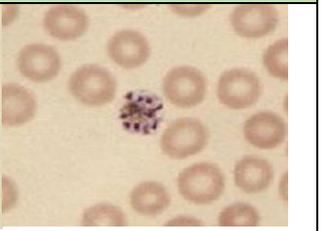
Após um período de incubação de duas semanas aparecem sintomas como febre, calafrios e outros sintomas mais agressivos como edema pulmonar, malária cerebral ou insuficiência renal aguda (Ferreira e Sousa, 2002).

Em geral o *Plasmodium* é o agente mais temido devido à sua agressiva patogenia e alto índice de resistência à terapêutica (Ferreira e Sousa, 2002).

Diagnóstico Laboratorial

Na secção de Microbiologia recorre-se ao método de esfregaço de sangue periférico com coloração de Wright para observação microscópica das estruturas parasitárias e contagem dos parasitas para uma quantificação da parasitémia.

Tabela 23 - Estruturas possíveis de observar em esfregaço sanguíneo periférico com coloração Wright (Maza, Pezzlo e Baron, 1997).

<i>Plasmodium falciparum</i> (trofozoíto)	<i>Plasmodium vivax</i> (trofozoíto)	<i>Plasmodium ovale</i> (trofozoíto)	<i>Plasmodium malariae</i> (trofozoíto em banda)
			
(gametócito)	(esquizonte)	(esquizonte)	(esquizonte)
			

- *Trichomonas vaginalis*

A *Trichomonas vaginalis* é um parasita flagelado urogenital que causa a tricomoniose, causando vaginites e uretrites. É das parasitoses mais frequentes e tem distribuição mundial sendo esta uma doença de transmissão sexual (Ferreira e Sousa, 2002).

Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial é realizado a partir de uma suspensão da zaragatoa, com amostra de exsudado cervico vaginal, com soro fisiológico. A incubação é de 30 minutos a uma temperatura de 37°C.

Observa-se ao microscópio, através de um exame a fresco, os movimentos típicos deste parasita.

- *Trichuris trichiura*

Trichuris trichiura é um parasita comum, de distribuição mundial. Os vermes adultos apresentam uma extremidade mais grossa que lhes confere uma forma comparada a um chicote.

Estes vermes adultos vivem geralmente no cego e a sua infecção pode ser assintomática ou causar disenteria.

Os seus ovos apresentam-se numa forma de limão com uma parede muito espessa, resistentes aos fatores ambientais. A sua contaminação é feita através da água ou alimentos contaminados. A sua prevenção e controlo é feita através de higienização alimentar e higiene individual.

O diagnóstico laboratorial realiza-se através da pesquisa dos ovos nas fezes (Ferreira e Sousa, 2002)



Figura 13 - Ovo de *Trichuris trichiura* (Maza, Pezzlo e Baron, 1997).

- Parasitas Intestinais

Em casos de suspeita clínica de parasitose intestinal, o exame parasitológico de fezes é fundamental, como forma de proceder à identificação de ovos de helmintas, quistos ou trofozoítos de protozoários (Ferreira e Sousa, 2002).

A técnica mais utilizada nos exames parasitológicos é a de concentração permitindo aumentar o número de estruturas visíveis na preparação, eliminar qualquer resíduo orgânico fecal e apresentarem os organismos num estado inalterado de forma a serem identificados.

O método utilizado é o método de Ritchie modificado. É adicionada a amostra numa suspensão de formalina e éter que permitem estabilidade estrutural dos parasitas. A amostra é centrifugada a 1500rpm durante 10 minutos separando os lípidos, o formol e o éter do sedimento que contém os parasitas. Após decantação é realizado um exame a fresco observando-se microscopicamente as estruturas parasitárias.

5.10 Testes imunocromatográficos

Os testes imunocromatográficos permitem uma resposta rápida através da deteção de um microrganismo a partir de uma reação antigénio-anticorpo numa matriz porosa que permite a migração da amostra. Quando o complexo antigénio-anticorpo fica retido nas tiras que

contêm uma molécula específica que se liga ao complexo, apresenta cor, tornando visível a presença do antígeno do microrganismo na amostra. Geralmente estes testes apresentam uma tira de controlo na matriz que retém qualquer molécula que flui sobre a tira, demonstrando que a técnica foi realizada com sucesso.

- Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* Antigen Card

Este teste é um ensaio imunocromatográfico rápido *in vitro* para a deteção do antígeno *Streptococcus pneumoniae* na urina de doentes com pneumonia e no líquido cefalorraquidiano de doentes com meningite.

A matriz contém o anticorpo-*Streptococcus pneumoniae* de coelho na tira da amostra adsorvido sobre uma membrana de nitrocelulose. O controlo é apresentado na mesma membrana numa tira diferente.

Para realizar o teste é mergulhada uma zaragatoa na amostra e inserida no cartão de teste, sendo adicionadas gotas de uma solução tampão. O cartão é fechado permitindo o contacto da amostra com a tira de teste. O antígeno pneumocócico presente na amostra reage para ligar o anticorpo do conjugado anti-*Streptococcus pneumoniae*. Os resultados do teste são interpretados pela presença ou ausência de linhas visualmente detectáveis de cor rosa. Um resultado de teste positivo, lido em 15 minutos, incluirá a deteção da linha de amostra e de uma linha de controlo.

- Binax NOW *Legionella* Urinary Antigen Card

O ensaio imunocromatográfico serve para detetar qualitativamente o antígeno solúvel de *Legionella pneumophila* serogrupo I na urina de doentes com sintomas de pneumonia. Auxilia no diagnóstico presuntivo da Doença do Legionário.

O seu procedimento é idêntico ao descrito no capítulo 8.1.

- TECHLAB C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE

Após o tratamento com antibióticos, muitos doentes desenvolvem problemas gastrointestinais, que vão desde diarreia leve a colite pseudomembranosa grave. Muitos casos das formas mais leves da doença gastrointestinal e a maioria dos casos de colite pseudomembranosa são causadas por estirpes de *Clostridium difficile*, uma bactéria anaeróbia oportunista que produz toxina no intestino quando a microflora sofre alterações devido ao uso de antibióticos.

O teste TECHLAB C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE é um ensaio imunoenzimático de membrana para a detecção simultânea do antigénio glutamato desidrogenase e das toxinas A e B do *Clostridium difficile* num único poço de reação. O dispositivo contém uma janela de reação com três linhas verticais de anticorpos imobilizados, uma com anticorpos contra glutamato desidrogenase, outra que contém anticorpos contra as toxinas A e B e por último uma linha de controlo que contém anticorpos de antiperoxidase de rábano. Para executar o teste, a amostra é adicionada num tubo que contém uma amostra de diluente e conjugado. A mistura é adicionada ao poço de amostras e incubada à temperatura ambiente durante 15 minutos para que ocorra a reação antigénio-anticorpo enquanto migram para a janela da reação. Nessa janela é adicionado um substrato que irá apresentar visualmente as reações.



Figura 14 - Dispositivo do C. DIFF COMPLETE.

- COMBI-STRIP

As diarreias e as gastroenterites humanas podem ser causadas por vírus e bactérias. Cerca de 45% das diarreias nas crianças são causadas por vírus.

O *Rotavírus* é a principal causa de gastroenterites nas crianças. Transmite-se por contacto oral e fecal e com um período de incubação de mais ou menos 3 dias, causa febres, vómitos e diarreias que podem durar até 10 dias.

Em segundo lugar encontra-se o *Adenovirus*. A sua contaminação segue por via oral e fecal, mas pode também contaminar por inalação. A incubação dura cerca de 5 a 8 dias e causa inflamação no estômago e intestino provocando diarreia, vómitos, febre e cólicas abdominais.

O Combi-Strip é um teste rápido de diagnóstico *in vitro* para a detecção de Rotavírus e Adenovírus em amostras fecais. Dois anticorpos monoclonais conjugados com partículas de

ouro contra proteínas específicas de Adenovírus e Rotavírus garantem a especificidade do teste.

O teste apresenta uma tira que é mergulhada na suspensão da amostra fecal, na qual os conjugados solubilizados migram por difusão passiva com a amostra que irá passar por três tipos de anticorpos monoclonais em faixas diferentes de Adenovirus, Rotavirus e o controlo. Caso os antígenos específicos estejam presentes haverá a formação do complexo antígeno-anticorpo produzindo uma cor.

- RSV RESPI-STRIP

O vírus sincicial respiratório (RSV) é a maior causa de doenças respiratórias em todas as idades, embora cause infeções do trato respiratório severas em crianças com menos de 4 anos. É um vírus altamente contagioso a partir de secreções respiratórias.

O RSV afeta tanto o trato respiratório superior como o inferior, embora afete com mais frequência o trato respiratório inferior causando pneumonia e bronquiolite.

Este teste permite fazer a deteção de RSV em secreções nasofaríngeas. Quando a amostra entra em contacto com a tira de teste, o conjugado solubilizado migra com a amostra por difusão passiva e entram em contacto com o anticorpo anti-RSV que é adsorvido na matriz de nitrocelulose. Após incubação à temperatura ambiente durante 15 minutos, aparecerá duas linhas caso seja uma amostra positiva. As duas linhas representam a presença de RSV e do controlo do teste.

6. Conclusões

A realização do estágio no hospital de Santa Luzia em Viana do Castelo proporcionou um aprofundamento dos conhecimentos teóricos transmitidos ao longo do Mestrado em Análises Clínicas, aplicando-os a uma rotina prática laboratorial diária.

A aplicabilidade do controlo de qualidade interno e a avaliação de qualidade externa foram demonstradas ao longo do estágio apresentado uma maior confiança no resultado obtido.

Tendo como base de licenciatura Microbiologia direcionada para a área alimentar e ambiental, foi de extremo interesse poder estagiar na área clínica. A passagem na secção de Microbiologia permitiu desenvolver competências práticas na sementeira de produtos biológicos, tendo sempre em conta a base teórica. É de notar que durante a minha passagem na secção surgiram situações que afetaram a estrutura de trabalho. Apesar destas dificuldades, toda a equipa da secção de Microbiologia continuou a demonstrar disponibilidade para me orientar e explicar todo o processo de identificação e suscetibilidade de agentes patogénicos.

As secções de Hematologia, Imunoquímica e Imunohemoterapia proporcionaram uma experiência de grande valor, tanto teórico como prático. Foi possível, como componente prática, utilizar vários analisadores, com fundamentos e metodologias diferentes.

Sendo um estágio dirigido para Técnicos Superiores, foi possível interpretar os resultados obtidos e avaliar esses mesmos resultados, comparando com o historial clínico do utente.

Numa nota pessoal, foi de extrema importância a avaliação microscópica de esfregaços de sangue periféricos, efetuados na secção de Hematologia, visto ser uma área que me trouxe maior interesse ao longo do estágio. Essa avaliação microscópica permitiu-me ganhar experiência visual, para interpretar os dados obtidos pelos analisadores hematológicos automáticos, observação e avaliação da maturidade das células sanguíneas e patologias associadas.

O estágio contribuiu para a transição mais importante da vida, a passagem de estudante para trabalhador. Colaborou também para que tivesse uma visão global das análises clínicas e o valor que os métodos complementares de diagnóstico apresentam.

7. Bibliografia

BARNES, Patrick - **Hematology: Learning Guide.** : ABBOTT Laboratories, 2010.

BIOMÉRIEUX - **Manual de meios de cultura e suplementos.** França : BioMérieux SA, 2003.

BYRNE, A. Nthony L. *et al.* - Peripheral venous and arterial blood gas analysis in adults : are they comparable? A systematic review and meta-analysis. **Respirology.** 19:August 2013 (2014) 168–175. doi: 10.1111/resp.12225.

Dreamstime - [Em linha], atual. 2015. [Consult. 10 mai. 2015]. Disponível em WWW:<URL:<http://www.dreamstime.com/stock-illustration-structure-sperm-cell-human-anatomy-vector-diagram-image43980330>>

FERREIRA, Wanda Canas; SOUSA, João Carlos De - **Microbiologia.** Volume 1 ed. : LIDEL, 1998. ISBN 972-757-024-0.

FERREIRA, Wanda; SOUSA, João Carlos De - **Microbiologia.** Volume 3 ed. Porto : LIDEL, 2002. ISBN 972-757-136-0.

FONSECA, Dr. Fernando - **Colheita, Transporte e Sementeira Primária de Produtos Biológicos.** : Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Santa Luzia, 2001.

FORBES, Betty A.; SAHM, Daniel F.; WEISSFELD, Alice S. - **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology.** 12th. ed : Mosby Elsevier, 2007. ISBN 978-0-323-03065-6.

FORBES, Betty; SAHM, Daniel; WEISSFELD, Alice - **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology.** 10th. ed : Mosby-Year Book, 1998. ISBN 0-8151-2535-6.

GEER, John P. *et al.* - **Wintrobe's Clinical Hematology** : Wolters Kluwer Health, 2013.

HENRICHS, Prof.; R., Dr Helmut - **HbA1c - Glycated Hemoglobin and Diabetes Mellitus.** 1st. ed. London : UNI-MED SCIENCE, 2009.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. - **Fundamentos em Hematologia.** Londres : artmed, 2013.

JE, Hansen; DH, Simmons - A systematic error in the determination of blood PCO₂. **The American Review of Respiratory Disease.** 1977) 1061–1063.

LINDELL, S. S.; QUINN, P. - Use of bile esculin agar for rapid differentiation of Enterobacteriaceae. **Journal of Clinical Microbiology.** . ISSN 00951137. 1:5 (1975) 440–443.

MAZA, Luis De La; PEZZLO, Marie; BARON, Ellen Jo - **Color Atlas of Diagnostic Microbiology.** USA : Mosby-Year Book, 1997.

MIDDLETON, P. *et al.* - Agreement between arterial and central venous values for pH, bicarbonate, base excess, and lactate. **Emergencie Medical Journal.** 2006) 622–624.

PHADKE, Achyut M.; MORTIMER, David - **Clinical Atlas of Sperm Morphology**. 1st. ed. India : Jaypee Brothers Medical Publishers, 2007.

ROSA-FRAILE, MANUEL DE LA CAMACHO-MUÑOZ, Enrique - Liquid Granada Medium for Detection of Group B Streptococci. **Journal of Clinical Microbiology**. 2005) 8.

SAUNDERS (ED.) - **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 22nd. ed. : Elsevier, 2011. ISBN 978-1-4377-0974-2.

SCHWABE, Lynn D. *et al.* - Evaluation of BACTEC 9240 Blood Culture System by Using High-Volume Aerobic Resin Media. 33:9 (1995) 2451–2453.

SYSMEX CORPORATION - **Automated Hematology Analyzer XE-5000**. Koba : Sysmex Corporation, 2008.

SYSMEX CORPORATION - **Sysmex Corporation web site** [Em linha], atual. 2015. [Consult. 15 fev. 2015]. Disponível em WWW:<URL:<http://www.sysmex-europe.com/academy.html>>

TEIXEIRA, Lúcia Martins *et al.* - Manual of Clinical Microbiology, 10th edition. Em **Manual of Clinical Microbiology, 10th edition**. ISBN 9781555816780. p. 350–364.

THORSON, S. H. *et al.* - Variability of arterial blood gas values in stable patients in the ICU. **CHEST Journal**. 1983) 14–18.

VANDEPITTE *et al.* - **Basic laboratory procedures in clinical bacteriology**. Geneva : World Health Organization, 2003.

VENNAPUSA, Bharathi *et al.* - Erythrocyte sedimentation rate (ESR) measured by the Streck ESR-Auto Plus is higher than with the Sediplast Westergren method a validation study. **American Journal of Clinical Pathology**. . ISSN 00029173. 135:3 (2011) 386–390. doi: 10.1309/AJCP48YXBDGTGXEV.

WHO - **World Health Organization laboratory manual for the Examination and processing of human semen** : WHO Press, 2010.

ANEXOS

ANEXOS

HEMATOLOGIA

Anexo I.

Tabela 1 - Parâmetros avaliados pelo Sysmex XE-5000.

Parâmetro	Designação
RBC	Eritrócitos (n°/L)
PLT	Plaquetas (n°/L)
Hb	Hemoglobina (g/dL)
Hct	Hematócrito (%)
MCV	Volume corpuscular médio (fL)
MCHC	Concentração de Hb corpuscular média (g/dL)
MCH	Hemoglobina corpuscular média (pg)
WBC	Leucócitos (n°/L)
%Neut e #Neut	Neutrófilos (% e valor absoluto)
%Mono e #Mono	Monócitos (% e valor absoluto)
%Lymph e #Lymph	Linfócitos (% e valor absoluto)
%Eos e #Eos	Eosinófilos (% e valor absoluto)
%Baso e #Baso	Basófilos (% e valor absoluto)
%IG e #IG	Granulócitos Imaturos (% e valor absoluto)
RDW	Distribuição do tamanho das células eritrocitárias
HDW	Distribuição da hemoglobina pelas células
MPV	Volume médio plaquetário
IRF	Fração de reticulócitos imaturos
IPF	Fração de plaquetas imaturas
%NRBC e #NRBC	Eritroblastos (% e valor absoluto)
PLT-O	Plaquetas contadas pelo método ótico
%Retic e #Retic	Reticulócitos (% e valor absoluto)
Retic-He	Hb dos reticulócitos
HPC	Células progenitoras hematopoiéticas
%Hypo	% Células hipocrômicas
%Hyper	% Células hiperocrômicas
%Macro	% Células macrocíticas
%Micro	% Células microcíticas

Anexo 2.

Tabela 2 - Valores de referência hematológicos segundo a Direção Geral da Saúde.

Parâmetro (Unidades)	Sexo	Idade	Valor de referência	Valores críticos	
				Baixo	Alto
RBC ($\times 10^{12}/L$)	M/F	0-6 meses	3.90 – 5.90	Não há	Não há
	M/F	6 meses- 11 anos	3.80 – 5.40		
	M	>11 anos	4.31 – 6.40		
	F	>11 anos	3.85 – 5.20		
HGB (g/dL)	M/F	0-6 meses	14.0 – 18.0	<10.0	>19.9
	M/F	6 meses- 11 anos	11.0 – 14.0	<6.0	
	M	>11 anos	13.6 – 18.0	<6.0	
	F	>11 anos	11.5 – 16.0	<6.0	
HTC(%)	M/F	0-2 semanas	42.0 – 68.0	<30.0	>61.0
	M/F	2 sem – 6 meses	35.0 – 50.0	<18.0	
	M/F	2 meses – 1 ano	30.0 – 40.0	<18.0	
	M	1 – 5 anos	32.0 – 42.0	<18.0	
	F	>5 anos	39.8 – 52.0	<18.0	
	F	>5 anos	34.7 – 46.0	<18.0	
MCV (fL)	M/F	0-2 semanas	88.0 – 114.0	Não há	Não há
	M/F	2sem – 6 meses	85.0 – 97.0		
	M/F	6 mes – 11 anos	72.0 – 86.6		
	M/F	>11 anos	80.0 – 97.0		
MCH (pg)	M/F	0-2 semanas	34.0 – 37.0	Não há	Não há
	M/F	2sem – 6 meses	31.0 – 36.0		
	M/F	6 mês – 5 anos	25.0 – 31.0		
	M/F	>5 anos	26.0 – 34.0		
MCHC (g/dL)	M/F	0-2 semanas	31.0 – 35.0	Não há	Não há
	M/F	2sem – 6 meses	32.0 – 35.0		
	M/F	>6 meses	32.0 – 36.0		
RDW (%)	M/F	0-2 dias	14.9 – 18.7	Não há	Não há
	M/F	>2 dias	11.5 – 15.0		
PLT ($\times 10^9/L$)	M/F	0-2 meses	140 – 440	<100	>1000
	M/F	>2 meses	140 – 440	<25	>1000
MPV (fL)	M/F	Qualquer idade	6.5 – 12.4	Não há	Não há
WBC ($\times 10^9/L$)	M/F	0-2 meses	5.0 – 20.0	<1.0	>30.0
	M/F	2 meses – 5 anos	4.5 – 17.0	<1.0	>30.0
	M/F	5 – 11 anos	4.5 – 13.0	<1.0	>30.0
	M/F	>11 anos	4.0 – 10.0	<1.0	>30.0

NEU ($\times 10^9/L$)	M/F	0-6 dias	1.5 – 16.0	<0.50	Não há
	M/F	6 dias – 2 meses	0.8 – 9.0	<0.50	
	M/F	2 meses – 1 ano	0.7 – 7.6	<0.50	
	M/F	1 – 5 anos	1.5 – 11.0	<0.50	
	M/F	5 – 11 anos	1.5 – 8.5	<0.50	
	M/F	>11 anos	1.5 – 8.0	<0.50	
LYM ($\times 10^9/L$)	M/F	0 – 6 dias	0.5 – 10.0	Não há	Não há
	M/F	6 dias – 5 anos	2.0 – 14.0		
	M/F	5 anos – 11 anos	1.0 – 7.8		
	M/F	>11 anos	0.8 – 4.0		
MONO ($\times 10^9/L$)	M/F	0 – 2 meses	0.0 – 2.4	Não há	Não há
	M/F	2 meses – 5 anos	0.0 – 2.0		
	M/F	5 – 11 anos	0.0 – 1.6		
	M/F	>11 anos	0.0 – 1.2		
EOS ($\times 10^9/L$)	M/F	0 – 2 meses	0.0 – 1.4	Não há	Não há
	M/F	2 meses – 5 anos	0.0 – 1.2		
	M/F	5 – 11 anos	0.0 – 0.9		
	M/F	>11 anos	0.0 – 0.3		
BASO ($\times 10^9/L$)	M/F	0 – 2 meses	0.0 – 0.6	Não há	Não há
	M/F	2 meses – 5 anos	0.0 – 0.5		
	M/F	5 – 11 anos	0.0 – 0.4		
	M/F	>11 anos	0.0 – 0.3		

Anexo 3.

Casos clínicos relevantes durante o Estágio no Hospital de Santa Luzia:

➤ Caso I

Sintomatologia:

O utente, de 37 anos, do sexo feminino, foi avaliado no Hospital de Santa Luzia e observou-se hipertermia, mialgias, dores de garganta e dor na perna esquerda.

Foram requisitados como métodos complementares de diagnóstico: Hemograma na secção de Hematologia e Química Clínica na secção de Imunoquímica.

Métodos Complementares de Diagnóstico:

GERAL				IMUNOQUÍMICA		
HEMOGRAMA				QUÍMICA CLÍNICA		
			V.R.			
Eritrocitos	1.59	10 ¹² /L	4.2-5.4	GLICOSE	130 mg/dL	70 - 110
Hemoglobina	5.3	g/dL	11.8-15.8	UREIA	24 mg/dL	17 - 43
Hematócrito	15.5	%	36.0-46.0	CREATININA	0.56 mg/dL	0.6 - 1.0
MCV	97.5	fL	80.4-96.4	SODIO	137 mmol/L	136 - 145
MCH	33.3	pg	26.7-30.7	POTASSIO	4.7 mmol/L	3.5 - 5.1
MCHC	34.2	g/dL	31.7-35.7	AMILASE	28 UI/L	22 - 80
RDW	13.9	%	< 15.0	BILIRRUBINA TOTAL	0.72 mg/dL	0.3 - 1.2
Leucocitos	3.94	10 ⁹ /L	4.0-10.0	FOSEFATASE ALCALINA (ALP)	47 UI/L	30 - 120
FORMULA LEUCOCITARIA				GAMA G.TRANSPEPTIDASE (GGT)	22 UI/L	<38
Neutrófilos	26.0	%	1.02 10 ⁹ /L	ASPARTAT-AMINOTRANSFERASE (AST)	17 UI/L	8 - 35
Eosinófilos	0.0	%	0.00 10 ⁹ /L	ALANINA-AMINOTRANSFERASE (ALT)	10 UI/L	7 - 45
Basófilos	0.0	%	0.00 10 ⁹ /L	PROTEINA C REACTIVA	3.89 mg/dL	0.01 - 0.82
Linfócitos	60.0	%	2.36 10 ⁹ /L	MARCADORES CARDIACOS		
Monócitos	1.0	%	0.04 10 ⁹ /L	MIOGLOBINA	80 ng/mL	1 - 147
Mieloblastos		%	10.0			
Promielócitos		%	2.0			
Metamielócitos		%	1.0			
PLAQUETAS	56	10 ⁹ /L	150-400			
N.Eritroblastos/100 Leucocitos	10.00	%				

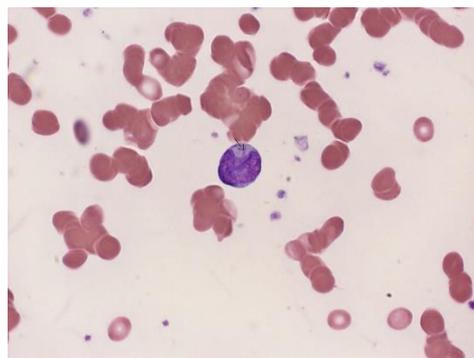
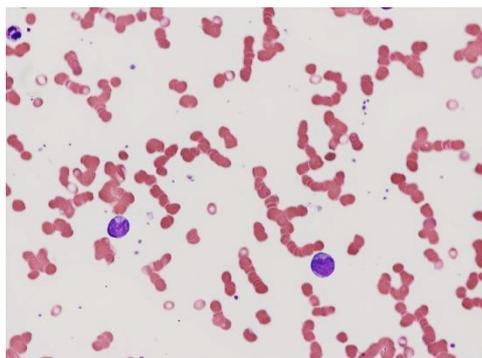
O Hemograma indicou que o utente se encontrava com anemia e um número inferior de eritrócitos que os indicados nos valores de referência. Apresentava também uma inversão na fórmula leucocitária, em que os leucócitos se encontravam em maior quantidade que os neutrófilos.

A nível plaquetar é assinalada uma possível trombocitopenia.

Na química clínica, o parâmetro que chama mais a atenção é a Proteína C Reativa, que se encontra muito elevada, indicando um processo de inflamação aguda.

Após a avaliação dos resultados registados pelos sistemas automáticos hematológicos, foi realizado um esfregaço sanguíneo periférico.

Esfregaço Sanguíneo Periférico:



No ESP foi possível observar *Rouleaux* eritrocitário.

Confirmou-se a trombocitopenia, não havendo presença de aglomerados plaquetares.

A inversão de fórmula leucocitária foi confirmada, havendo presença de corpos de Auer no citoplasma das células blásticas. A sua presença indica que a utente pode estar perante uma leucemia mieloide aguda.

➤ Caso II

Sintomatologia:

O utente, de 18 anos, do sexo masculino, entrou no Serviço de Urgência com Hipertermia, acessos de tosse, palidez acentuada e dor torácica posterior.

Foi requisitado ao Serviço de Patologia Clínica um Hemograma e um estudo bioquímico.

Métodos Complementares de Diagnóstico:

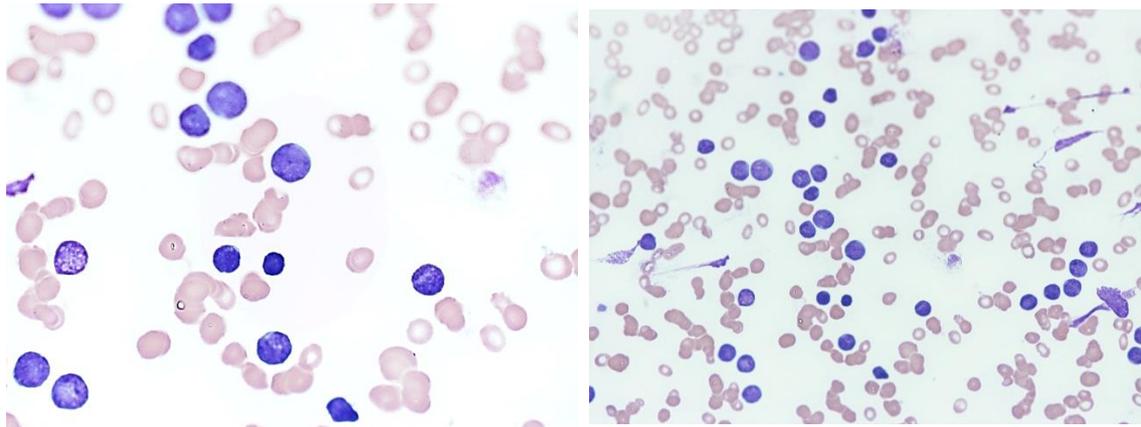
GERAL				QUÍMICA CLÍNICA			
HEMOGRAMA				UREIA	24 mg/dL	17 - 43	
Eritrocitos		2.12 $10^{12}/L$	v.r.	4.2-5.4			
Hemoglobina		5.8 g/dL		13.2-17.2	CREATININA	0.94 mg/dL	0.8 - 1.3
Hematócrito		17.4 %		41.0-51.0	SODIO	140 mmol/L	136 - 145
MCV		82.1 fL		80.1-96.1	POTASSIO	4.9 mmol/L	3.5 - 5.1
MCH		27.4 pg		26.7-30.7	PROTEINA C REACTIVA	10.03 mg/dL	0.01 - 0.82
MCHC		33.3 g/dL		31.7-35.7	GLICOSE 0 Min	96 mg/dL	70 - 105
RDW		20.5 %		< 15.0			
Leucocitos		147.05 $10^9/L$		4.0-10.0			
FORMULA LEUCOCITARIA							
Neutrófilos	1.0 %	1.47 $10^9/L$		55.0-75.0			
Eosinófilos	0.0 %	0.00 $10^9/L$		1.0-3.0			
Besofilos	0.0 %	0.00 $10^9/L$		< 2.0			
Linfocitos	1.0 %	1.47 $10^9/L$		17.0-33.0			
Monocitos	0.0 %	0.00 $10^9/L$		5-9			
Células Blásticas		98.0 %					
PLAQUETAS		22 $10^9/L$		150-400			

O Hemograma deu a indicação de que o utente se encontrava com anemia, leucocitose e possível trombocitopenia.

O autoanalisador não realizou a fórmula leucocitária, embora registou 98% de células blásticas.

No estudo bioquímico, é possível verificar um valor muito elevado de Proteína C reativa, demonstrando que o utente se encontra num processo inflamatório.

Esfregaço Sanguíneo Periférico:



No ESP foi possível confirmar a fórmula leucocitária, estando presentes 98% de células blásticas.

O utente foi transportado para o Hospital de São João. O diagnóstico final foi registado como reação leucemóide, anemia e trombocitopenia.

➤ Caso III

Sintomatologia:

Utente de 49 anos, apresentou-se no Serviço de Urgências, com febre que perdura por duas horas, durante três dias. A sua temperatura corporal chegou aos 40°C.

O utente referiu que chegou de Angola, país onde trabalha a tempo inteiro. Queixou-se de cefaleias e náuseas.

Foram requisitadas análises hematológicas, microbiológicas e bioquímicas ao Serviço de Patologia Clínica.

Métodos Complementares de Diagnóstico:

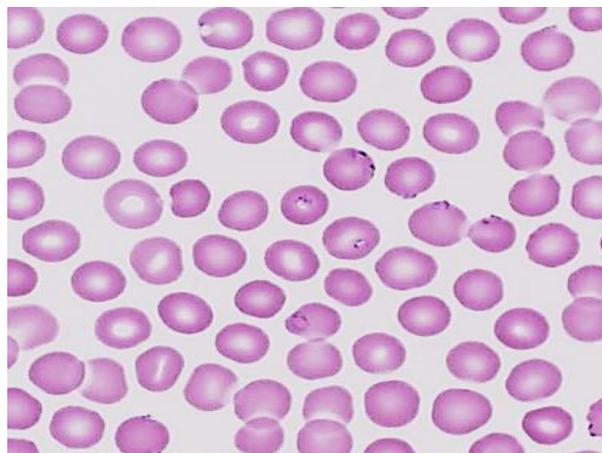
HEMATOLOGIA			MICROBIOLOGIA		
GERAL			Parasitologia		
HEMOGRAMA			PESQUISA DE PLASMODIO		
Eritrócitos	5.48 $10^{12}/L$	4.2-5.4	Pesquisa de Parasitas	Positivo	Negativo
Hemoglobina	17.1 g/dL	13.2-17.2	Nº Parasitas por RBC	19%	
Hematócrito	48.8 %	41.0-51.0	Observações	<i>P. falciparum</i>	
MCV	88.7 fL	80.0-96.0			
MCH	31.2 pg	26.7-30.7			
MCHC	35.2 g/dL	31.7-35.7			
RDW	12.7 %	< 15.2			
Leucócitos	6.84 $10^9/L$	4.0-10.0			
FORMULA LEUCOCITARIA			IMUNOQUÍMICA		
Neutrófilos	87.3 %	5.00 $10^9/L$	55.0-75.0	QUÍMICA CLÍNICA	
Eosinófilos	1.0 %	0.10 $10^9/L$	1.0-3.0	GLICOSE	184 mg/dL 70 - 110
Basófilos	0.2 %	0.01 $10^9/L$	< 2.0	UREIA	40 mg/dl 17 - 43
Linfócitos	6.3 %	0.42 $10^9/L$	17.0-33.0	CREATININA	1.08 mg/dL 0.8 - 1.3
Mastócitos	3.6 %	0.24 $10^9/L$	5-9	SODIO	136 mmol/L 136 - 145
Granulócitos Imaturos	1.1 %	0.07 $10^9/L$	< 3.0	POTASSIO	3.9 mmol/L 3.5 - 5.1
Retículoendotélio	2.8 %			AMILASE	50 UI/L 22 - 80
PLAQUETAS	31 $10^9/L$	150-400		BILIRRUBINA TOTAL	3.73 mg/dl 0.3 - 1.2
QUÍMICA CLÍNICA				FOSFATASE ALCALINA (ALP)	118 UI/L 30 - 120
URINA TIPO II				GAMA G. TRANSPEPTIDASE (GGT)	342 UI/L <55
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS				ASPARTAT-AMINOTRANSFERASE (AST)	105 UI/L 8 - 35
Densidade	1.017			ALANINA-AMINOTRANSFERASE (ALT)	80 UI/L 10 - 45
pH	5.0			PROTEINA C REACTIVA	17.79 mg/dL 0.01 - 0.82
ELEMENTOS ANORMAIS					
Proteínas	75.0 mg/dL				
Glucose	NORM				
Corpos cetônicos	5.0 mg/dL				
Urobilíogeno	8.0 mg/dL				
Bilirrubina	3.0 mg/dL				
Eritrócitos	25.00 /uL				
Nitritos	NRG				
Leucócitos	25.0 /uL				
CONTAGEM DE ELEMENTOS FIGURADOS					
Metodo:	Citometria de Fluxo				
Céls epiteliais de Descamação	7.5 /uL	0-10			
Células epiteliais tubulares	3.7 /uL	0-5			
Leucócitos	21.2 /uL	0-15			
Eritrócitos	108.5 /uL	0-15			
Eritrócitos nac lisados	108.5 /uL				
Leveduras	70.7 /uL				
Cilindros hialino-granulosos	Raros				
Bactérias	Numerosas				

O Hemograma apresentou um aumento de neutrófilos e diminuição de plaquetas.

O estudo bioquímico revelou aumento da bilirrubina livre, e valores hepáticos aumentados como a AST, ALT e GGT.

Na Urina Tipo II foi possível verificar uma libertação excessiva de leucócitos e eritrócitos. Com estas alterações registadas e o país de origem, o clínico sugeriu fazer uma pesquisa de *Plasmodium spp.* o que veio a confirmar-se num esfregaço sanguíneo periférico.

Esfregaço Sanguíneo Periférico:



No ESP foi possível confirmar a presença de trofozoítos de *Plasmodium falciparum* com um registo de 19 eritrócitos parasitados a cada cem observados.