



Ana Rute Serrano Nunes

Relatório de Estágio no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar S. João, Porto

Relatório de estágio realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela
Dr.^a Teresa Carvalho e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Rute Serrano Nunes

Relatório de Estágio no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar S. João, Porto

Relatório de estágio realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela
Dr.^a Teresa Carvalho e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda a equipa do serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar S. João, pela forma como me receberam e me acompanharam durante o estágio, mostrando sempre disponibilidade. E em particular à Dr.^a Teresa Carvalho que, na sua função de Orientadora de Estágio, de forma disponível e agradável, proporcionou a aquisição de conhecimentos na vertente teórico-prática, e possibilitou a implementação destes em situações práticas da atividade das análises clínicas, contribuindo para a melhoria das minhas competências técnicas que, certamente, constitui um suporte de conhecimentos fundamentais para futuramente iniciar uma atividade profissional no âmbito da carreira do farmacêutico especialista em análises clínicas.

A todos,

Um muito obrigada.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	7
RESUMO	9
INTRODUÇÃO.....	10
CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DO SERVIÇO DE PATOLOGIA CLÍNICA DO CHSJ	11
MICROBIOLOGIA CLÍNICA	11
Controlo da Qualidade Interno e Externo.....	11
Organização e objetivos do Setor de Microbiologia Clínica do Serviço de Patologia Clínica do CHSJ.....	12
Obtenção, Conservação e Processamento de Amostras biológicas em Microbiologia	13
Fatores de crescimento	13
Meios de Cultura	14
Processamento das amostras por tipo de produtos	15
Exame bacteriológico, micológico e parasitológico	15
Métodos de Identificação Bacteriana	23
Identificação de bacilos de Gram negativo	23
Identificação de cocos de Gram positivo	24
Outras provas de Identificação microbiana (manuais)	25
Prova de Identificação microbiana (semiautomática)	26
Maldi-Vitek MS	26
Vitek® 2	26
Testes de Sensibilidade aos agentes antimicrobianos	26
E-test	27
Difusão em disco – Kirby-Bauer	27
Método automatizado Vitek® 2	27
Micobactérias	28
Laboratório das Micobactérias	28
Diagnóstico Laboratorial da Infecção por Micobactérias	29
Amostras biológicas	29
Exame micobacteriológico direto	31
Exame cultural	32
Identificação por sondas de DNA	34

Teste de sensibilidade aos antibióticos antibacilares.....	36
Testes rápidos para deteção de antígenos – imunodiagnóstico	37
Princípio dos testes rápidos imunocromatográficos	37
Kits disponíveis no Sector da Microbiologia Clínica do CHSJ	38
Imunodiagnóstico - Deteção de antígenos por imunofluorescência	38
Marcação por imunofluorescência.....	38
Controlo da qualidade em Imunofluorescência	39
Processamento das amostras	39
Critérios para interpretação da imunofluorescência	41
Serologia	41
Técnicas usadas no Serviço de Serologia do CHSJ.....	42
Testes rápidos imunocromatográficos	42
Provas manuais.....	42
Automatização em serologia (ELISA).....	43
HEMATOLOGIA CLINICA	46
Introdução	46
Colheita, Conservação e Transporte das amostras sanguíneas.....	46
Processamento das amostras.....	47
Controlo da Qualidade Interno e Externo.....	47
Estudo Laboratorial das Células Sanguíneas	48
Sistema hematopoiético	48
Técnicas laboratoriais em Hematologia Celular.....	53
Hemograma e citologia.....	53
Outros Estudos Laboratoriais.....	59
Velocidade de sedimentação.....	59
Hemoglobina glicada.....	60
Validação biopatológica dos resultados.....	61
Análise de histogramas e scattergramas.....	61
Estudo de Extensão de sangue periférico normal	62
CONCLUSÃO.....	65
BIBLIOGRAFIA.....	66
ANEXOS.....	64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação de acordo com as necessidades em oxigénio.....	14
Tabela 2 – Processamento de amostras para urocultura.....	16
Tabela 3 – Critério para interpretação dos resultados de uroculturas.....	16
Tabela 4 – Meios de cultura e condições de incubação de amostras fecais.....	19
Tabela 5 – Características macroscópicas de exsudados genitais.....	22
Tabela 6 – Cartas de Identificação para Vitek [®] 2.....	26
Tabela 7 - Cartas de Sensibilidade aos Antimicrobianos utilizados no VITEK [®] 2.....	28
Tabela 8 - Processamento e tratamento de amostras para exame cultural micobacteriológico	29
Tabela 9 – Processamento de amostras pelo kit BBL MycoPrep.....	30
Tabela 10 - Caraterísticas das duas colorações ácido-álcool resistentes usadas no CHSJ.....	30
Tabela 11 – Características das duas colorações ácido-álcool resistentes usadas no CHSJ.....	32
Tabelas 12 - Critérios para o exame microscópico direto micobacteriológico	32
Tabela 13 - Características principais dos meios <i>Löwenstein-jensen</i> e <i>BD BBL MGIT, Mycobacteria Growth Indicator Tube</i>	33
Tabela 14 - Características principais dos meios <i>BD Frascos de Cultura BACTEC Mycol F Lytic</i>	33
Tabela 15 - Vantagens e desvantagens dos diferentes meios de cultura	34
Tabela 16 - Sensibilidade, especificidade, rapidez e necessidade de viabilidade dos bacilos de cada método de diaiagnóstico	34
Tabela 17 – Principais etapas do Sistema AccuProbe	35
Tabela 18 - Principais etapas do <i>Geno Type Mycobacterium CM/ AS</i>	36
Tabela 19 - Tempos médios de execução dos métodos: cultural, imunoenzimático, provas de identificação e testes de sensibilidade antimicrobiana.....	37

Tabela 20 - Tipo de amostras e respetivo tratamento em deteção de antígenos por imunofluorescência.....	41
Tabela 21 - Principais padrões de fluorescência	41
Tabela 22 – Controlo de qualidade no Laboratório de Hematologia.....	47
Tabela 23 - Locais de hematopoiese ao longo da idade	48
Tabela 24 - Características dos eritroblastos e eritrócitos: composição em ácidos nucleicos e localização medular ou no sangue periférico	49
Tabela 25 – Características da série granulocítica.....	50
Tabela 26 - Parâmetros determinados nos Autoanalísadores hematológicos Sysmex XE – 2100 D e Sysmex XE – 5000	53
Tabela 27 – Causas de anemia.....	54
Tabela 28 – Situações que conduzem à alteração do microhematócrito.....	55
Tabela 29 – Causas de micro e macrocitose eritrocitária.....	55
Tabela 30 - Avaliação do grau de saturação de Hb no eritrócito pela MCHC.....	56
Tabela 31 - Situações clínicas que conduzem ao aumento dos eritroblastos.....	56
Tabela 32 – Causas de alterações do número de reticulócitos.....	57
Tabela 33 – Determinação da VS pelos VES-MATIC CUBE 60 e VES MATIC CUBE 200.....	60
Tabela 34 - Dados obtidos a partir dos gráficos scattergrama e histograma.....	62
Tabela 35 - Técnica de <i>May-Grünwald-Giemsa</i> , afinidade dos distintos organelos celulares	63

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1 – Quistos de <i>Giardia lamblia</i>	20
Ilustração 2 - Fluxograma de trabalho para a identificação de cocos de <i>Gram</i> negativo	24
Ilustração 3 – Fluxograma de trabalho para a identificação de cocos de <i>Gram</i> negativo positivo.....	25
Ilustração 4 - Risco de exposição e contaminação na manipulação de amostras para exame micobacteriológico	29
Ilustração 5 - Processamento de amostras pelo kit BBL MycoPrep	31
Ilustração 6 – Procedimento de integração dos resultados do exame cultural de hemoculturas.....	34
Ilustração 7 – Células precursoras eritróides	48
Ilustração 8 – Características da série granulocítica.....	50
Ilustração 9 – Falsa trombocitopenia: agregados plaquetários, ou esquizócitos	57
Ilustração 10 – Eritrocitose com trombocitopenia e satelitismo plaquetário	57
Ilustração 11 – Avaliação qualitativa, quantitativa e diferencial leucocitária.....	59
Ilustração 12 - Disposição dos leucócitos ao longo da zona ideal para a contagem leucocitária.....	64
Ilustração 13 - Método para contagem leucocitária usado no CHSJ	64

ABREVIATURAS

ACA - Antígenos da cápside virais
ADN – Ácido Desoxirribonucleico
A.E.I – Avaliação Externa da Qualidade
ARN – Ácido Ribonucleico
ATCC – *American Type Culture Collection*
B-A-A-R – Bacilos Ácido Álcool Resistentes
CHSJ – Centro Hospitalar São João
CLED – Gelose Cystine Lactose Electrolyte Deficient
C.Q.I – Controlo da Qualidade Interna
CMV – Citomegalovírus
DGS – Direção Geral de Saúde
Diff – Diferencial Leucocitário
EA – Antígenos precoces
EBNA – Antígenos nucleares *Epstein-Barr*
EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético
GN – Gram Negativos
FITC - Fluorocromo Isotiocianato de Fluoresceína
Hb – Hemoglobina
HCM – Hemoglobin corpuscular média
HPLC – High Performance Liquid Chromatography
HSV – Vírus *Herpes simplex*
Ht – Hematócrito
IG – Granulócitos Imaturos
LCR – Líquido Cefalorraquídeo
MALDI-TOF - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
MCHC – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
MCV – Volume Corpuscular Médio
MIC – Concentração Mínima Inibitória
MPV - Volume Plaquetar Médio
MRSA – *Staphylococcus aureus* metilino resistente
NRBC – Nucleated Red Blood Cell
PCR – Reação da DNA Polimerase em cadeia
PDW – Platelet Distribution Width
PLT – Plaquetas

PLT- O – Plaquetas Óticas Fluorescentes
RBC – Red Blood Cell (eritrócitos)
RDW – Red Cell Distribution Width
RDW-SD – Desvio *standard* do índice RDW
RDW-CV – Coeficiente de variação do índice RDW
RET– Reticulócitos
SLS - Lauril Sulfato de Sódio
TSA – Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos
UFC – Unidades Formadoras de Colónias
UK NEQAS – United Kingdom National External Quality Assessment Service
UV – Ultra Violeta
VDRL - Venereal Disease Research Laboratory
VIH/SIDA – Vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida/ Síndrome de Imunodeficiência Humana Adquirida
WBC - White Blood Cell (leucócitos)
YER - Gelose Yersinia

RESUMO

O presente relatório de estágio, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, contém informação relativa às atividades desenvolvidas durante o estágio no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar S. João (CHSJ), decorrido entre 16 de Dezembro de 2015 e 27 de Maio de 2016.

Após uma breve introdução sobre o Serviço de Patologia Clínica, apresenta-se uma descrição mais detalhada das áreas de Microbiologia e Hematologia Clínicas: equipamentos, princípios das metodologias utilizadas e abordagem a alguns dos principais parâmetros laboratoriais com o respetivo enquadramento teórico e importância clínica.

Palavras-chave: CHSJ, Patologia Clínica, Microbiologia Clínica e Hematologia Clínicas.

This internship report, in the context of the Master`s degree in Clinical Analyses, contains information on the activities carried out during the internship in Clinical Pathology Service at Hospital S.João (CHSJ), between 16th December 2015 and 27th May 2016.

After a brief introduction about the Clinical Pathology Service, is presented a more detailed description of the areas of Microbiology and Clinical Hematology: equipment, principles of the methodologies used and the approach to some of the main laboratory parameters with the respective theoretical framework and clinical importance.

Keywords: CHSJ, Clinical Pathology, Clinical Microbiology and Clinical Hematology.

INTRODUÇÃO

Estando em processo de especialização em Análises Clínicas pelo Colégio de Especialidades da Ordem dos Farmacêuticos, o ingresso no Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra veio permitir a aquisição de conhecimentos teóricos e práticos essenciais a esta formação atendendo ao cariz profissionalizante deste Mestrado. Este apresenta um plano de estudos que abrange as componentes teóricas e práticas inerentes às actividades das Análises Clínicas, com duração de quatro semestres letivos, realizando um Estágio Curricular final num Laboratório de Análises Clínicas, privado ou público, com a duração de 6 meses.

Neste contexto, realizei o Estágio Curricular no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Hospital S. João, Porto, Portugal, que decorreu entre 16 de dezembro de 2015 e 27 de maio de 2016. O Diretor de Serviço é o Professor Doutor Tiago Guimarães e a Dra. Teresa Carvalho, Farmacêutica, Técnica Superior de Saúde, Assessora Principal a exercer atividade no Laboratório de Microbiologia, no sector das Micobactérias assumiu a orientação do estágio.

O presente relatório apresenta sucintamente o local e a dinâmica das actividades desenvolvidas, com destaque para as valências de Microbiologia e Hematologia Clínicas relativamente aos parâmetros bioanalíticos determinados e importância clínica, equipamentos, técnicas e metodologias, e a importância do controlo da qualidade. Contém também alusões, sempre que possível, à experiência pessoal contextualizada por explicações teóricas adquiridas ao longo do Mestrado e bibliografia consultada.

CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DO SERVIÇO DE PATOLOGIA CLÍNICA DO CHSJ

O Serviço de Patologia Clínica, integra o Centro de Medicina Laboratorial que compreende também o Serviço de Anatomia Patológica e o Serviço de Imunohemoterapia. Desempenha um papel crucial na saúde do doente, pois é através dos dados laboratoriais obtidos que o clínico sustenta a tese de diagnóstico e estabelece estratégias terapêuticas não farmacológicas e/ou farmacológicas. De modo a garantir um trabalho de excelência, a equipa técnica deste Serviço consolida e atualiza conhecimentos teóricos e práticos, por forma a entender a complexidade do sistema integrante, sempre com uma abordagem multidisciplinar e de cooperação.

Por um lado, para que os resultados laboratoriais apresentem qualidade, o laboratório tem de garantir rigor nas 3 fases que precedem a libertação do resultado analítico: Fase Pré-Analítica, Fase Analítica e Fase Pós-Analítica. A avaliação da qualidade deve ser inserida num contexto multidimensional e de forma quantitativa, através dum processo estatístico que é usado para monitorizar e avaliar os resultados obtidos diariamente, atuar para corrigir/eliminar as causas das não conformidades através de medidas corretivas e, ainda tomar medidas de prevenção para evitar novas ocorrências. O Serviço de Patologia Clínica do CHSJ participa em Programas de Controlo de Qualidade Interno (C.Q.I.) e de Avaliação Externa de Qualidade (A.E.Q. - Entidade Organizadora National External Quality Assessment Site - UK NEQAS), de modo a assegurar a credibilidade do Laboratório, gerando confiança nos resultados laboratoriais. Por outro lado, é fundamental a articulação entre os clínicos e o laboratório no sentido de estabelecer a seleção, a prioridade e a possibilidade de execução dos parâmetros analíticos que se adequem às necessidades de determinada patologia em geral e às do doente em particular.⁽¹⁾

MICROBIOLOGIA CLÍNICA

Controlo da Qualidade Interno e Externo. A questão da qualidade e da sua garantia constitui um tema muito complexo principalmente nas instituições públicas de prestação de cuidados de saúde, assim como nos laboratórios privados de Análises Clínicas. E, embora existam várias definições para a qualidade, todas se centram nas necessidades do cliente/doente (o beneficiário) e o médico (enquanto prescritor).⁽¹⁾

A Microbiologia Clínica Laboratorial tem por objetivo a interligação dos conhecimentos das áreas de Bacteriologia, Parasitologia, Micologia e Virologia Clínicas relativamente aos mecanismos de patogénese e características clínicas das doenças infecciosas dos vários sistemas do corpo humano, e consequente aplicação no diagnóstico clínico laboratorial.

Estuda, também, aqueles que são capazes de desenvolver relações de simbiose com o Homem e, portanto, de proteção contra os agentes patogénicos, constituindo a flora residente em diversas áreas anatómicas. No entanto, estas colonizações em contexto de imunossupressão do hospedeiro podem permitir o desenvolvimento de infeções oportunistas.

Apesar do tipo de testes usados em Microbiologia Clínica diferir de acordo com a classe do laboratório, recursos financeiros e humanos, no geral realiza-se, no caso das infeções bacterianas e fúngicas: exame macro e microscópico, cultural, identificação e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos, existindo vários métodos para a identificação dos microrganismos que se baseiam nas características genotípicas ou nas fenotípicas.

O Microbiólogo, à medida que decorre o processamento da amostra e os testes laboratoriais, deve valorizar e reportar apenas os potenciais patogénicos. Deve, ainda, considerar que a valorização recorrente da flora normal conduz à prescrição desadequada de antibióticos e ao aparecimento de resistências emergentes. ⁽²⁾

Organização e objetivos do Setor de Microbiologia Clínica do Serviço de Patologia Clínica do CHSJ. O laboratório de Microbiologia Clínica encontra-se dividido em 5 áreas físicas distintas, contíguas e sequencialmente organizadas no âmbito do processamento laboratorial. Os produtos são processados inicialmente nas *Entradas*, depois nas *Continuações/Sensibilidades* pelos Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica, mediante indicação do Patologista ou do Técnico Superior de Saúde. As áreas da *Virologia* e das *Micobactérias* destinam-se aos produtos com pesquisas direcionadas para estes microrganismos, os quais têm de ser obrigatoriamente processados à parte para impedir contaminações cruzadas. E ainda, a área destinada à incubação e monitorização de Hemoculturas.

É da competência do Laboratório de Microbiologia Clínica do CHSJ efetuar colheitas, preparar, selecionar e armazenar os meios de cultura de acordo com o produto biológico e o agente etiológico a identificar; preparar os corantes para a coloração de Gram, Kinyoun, Auramina e outras colorações especiais; realizar sementeiras e respetivas repicagens e

isolamentos bacterianos; selecionar e interpretar os diversos métodos para os testes de sensibilidade aos antibióticos e fazer a leitura e interpretação do resultado laboratorial. ⁽²⁾

Obtenção, Conservação e Processamento de Amostras biológicas em Microbiologia. As amostras apenas são aceites se acompanhadas pelas respetivas requisições médicas, em recipientes próprios, em condições de transporte corretos e intactas. Relativamente à requisição médica (via informática), desta consta obrigatoriamente: dados relativos à identificação do doente (nome, idade, sexo, serviço e diagnóstico ou suspeita de diagnóstico), ao exame laboratorial e à data da colheita da amostra. O processamento e tratamento da amostra são orientados com base no pedido do clínico, na suspeita de diagnóstico, na proveniência da amostra (local anatómico, prováveis agentes infecciosos e flora associada) e nas condicionantes do doente (idade, sexo, atividade profissional, histórico clínico e terapêutico). Neste contexto, os fatores de crescimento intrínsecos ao(s) provável(eis) agente(s) microbiano(s) em causa têm de ser garantidos afim de preservar a viabilidade deste(s) ou do(s) seu(s) material(ais) genético(s).

Fatores de crescimento microbiano: A otimização das condições ambientais de suporte ao crescimento de bactérias e fungos de interesse clínico é tão importante quanto o conhecimento dos requisitos nutricionais para a obtenção de cultura *in vitro*.⁽²⁾ Os fatores críticos a considerar são:

a) **Temperatura:** fator que condiciona a velocidade com que as reações químicas associadas ao crescimento microbiano se estabelecem. Geralmente é definido um intervalo para a temperatura ideal: 35-37°C para a maioria dos microrganismos, 25±2° C para fungos não invasivos, 40°C para *Campylobacter* spp. e 4°C para *Yersinia enterocolitica*.

b) **Humidade:** A concentração de água nos meios sólidos de crescimento e de enriquecimento microbiano deve ser garantida no período de incubação, de forma correta. Se, por um lado, a evaporação de água pode inviabilizar o crescimento microbiano, por outro lado, o excesso de água pode propiciar o crescimento de contaminantes.

c) **Composição da atmosfera de incubação:** As bactérias e fungos são classificados de acordo com as necessidades em oxigénio, esquematizadas na tabela I que se segue. ⁽²⁾

Classificação	[O ₂]	[CO ₂]	Atmosferas artificiais
Aeróbios	21%	0,03% CO ₂	Não é necessário
Anaeróbios	0%	5% - 10%	Jarra ou saco de anaerobiose
Capnofílicos	15%	5% - 10%	Jarra com vela
Microaerofílicos	O ₂ 5%-10%	8% - 10%	Jarra ou saco especiais

Tabela I

A diferença entre aerobiose e anaerobiose prende-se com a capacidade de usar ou não a molécula de oxigénio como aceitador terminal de electrões (respiração celular), respetivamente. A grande maioria das bactérias é aeróbia, anaeróbia facultativa, ou anaeróbia estrita. Porém a maior parte dos microrganismos clinicamente relevantes são anaeróbios facultativos, ou seja, apresentam a capacidade de crescer na presença e na ausência de oxigénio.

d) pH: A maioria das bactérias com relevância clínica cresce melhor em ambientes neutros, ligeiramente alcalinos (6.5-7.5), enquanto que os fungos conseguem desenvolver-se num intervalo maior de pH, um pouco mais baixo que o ideal para as bactérias (5-6). Neste sentido, os meios de cultura comerciais são tamponados de modo a garantir este intervalo estreito de pH. ⁽²⁾

Meios de Cultura: Consistem na associação qualitativa e quantitativa de substâncias que fornecem os nutrientes necessários ao desenvolvimento de bactérias e fungos *in vitro*. A seleção do meio para inoculação da amostra é feita com base nos agentes patogénicos mais frequentemente envolvidos no processo infeccioso e na natureza da amostra. Os meios de cultura primários podem ser divididos em nutritivos (diferenciais ou não) e em seletivos (diferenciais ou não). E, ainda, os meios de enriquecimento que permitem aumentar a taxa de recuperação e deteção de bactérias anaeróbias a partir de amostras invasivas, mesmo quando as culturas forem incubadas em aerobiose.

Quanto à composição física, os meios de cultura podem ser sólidos (graças à adição de um agente solidificante, geralmente a agarose), semi-sólidos e líquidos, podendo existir meios bifásicos que contêm um meio líquido e uma fase sólida. Nos meios líquidos os nutrientes são dissolvidos em água e o crescimento bacteriano é indicado pela mudança de turvação, que aumenta com o crescimento bacteriano.

Finalmente, existem ainda meios de transporte que permitem garantir a viabilidade dos microrganismos por um período de cerca de 48-72 horas, sem que haja a multiplicação destes. No Anexo nº.I encontram-se esquematizados em tabela os diferentes meios de cultura usados durante o estágio. ⁽²⁾

Processamento das amostras por tipo de produtos: Algumas amostras requerem tratamento inicial antes da inoculação no meio de cultura primário, o qual pode incluir homogeneização, concentração (por centrifugação ou filtração), ou descontaminação. De modo a aumentar o crescimento e isolamento dos agentes patogénicos (bactérias e fungos), as amostras são inoculadas à superfície do meio sólido no sentido crescente de seletividade, através de técnicas de sementeira padronizadas que permitem obter colónias isoladas e efetuar uma análise semi-quantitativa. Se for feita uma análise quantitativa o resultado é dado em unidades formadoras de colónias por mL de amostra (UFC/mL). No Anexo nº. 2 são apresentadas as técnicas de sementeira mais frequentemente utilizadas na prática laboratorial, estando estas adaptadas ao tipo de produto biológico, meio de cultura, assim como ao fim a que se destina a própria sementeira.

Em algumas situações é realizado o exame microscópico direto após coloração específica de acordo com os agentes presentes na amostra. Durante o estágio realizei colorações de *Gram* (Microscopia ótica), *Kinyoun* (Microscopia ótica) e *Auramina* (Microscopia de Fluorescência), sendo abordada nesta parte do trabalho a coloração de Gram pois as restantes são desenvolvidas no diagnóstico das infeções por Micobactérias. A coloração de Gram permite diferenciar bactérias de Gram positivo (roxas) das de Gram negativo (rosas) devido às diferenças da composição da parede bacteriana - presença de ácidos teicóicos e de maior teor em peptidoglicano na parede celular das bactérias de Gram positivo. Resumidamente, esta coloração compreende várias etapas: preparação do esfregaço, adição do corante primário (violeta de cristal), do mordente (soluto de Lugol), do diferenciador (álcool) e do corante secundário (safranina). Esta coloração é a base dos testes de identificação bacteriana e permite obter dados preliminares clinicamente úteis na decisão de instituir ou não antibioterapia empírica. ⁽²⁾

EXAME BACTERIOLÓGICO, MICOLÓGICO E PARASITOLÓGICO

Urina

Exame cultural: As amostras de urina podem ser colhidas por profissionais de saúde, mas também pelo próprio doente (colheita por micção), mediante instruções do laboratório. Relativamente à colheita por micção, idealmente deve ser a primeira urina da manhã (colheita assética do jato médio) por se tratar de uma urina mais concentrada, ou após retenção durante 3 a 4 horas. A urina deve ser homogeneizada por inversão antes de se proceder à inoculação do meio de cultura, sendo processadas as amostras à chama de bico de Bunsen, mediante a informação da tabela 2. ⁽²⁾

Tipo de colheita	Meio de cultura	Tipo de Sementeira	Incubação
Micção ou por algaliação	CLED Sabouraud (se micológico)	Quantitativa, com ansa de 1 µL	
Nefrostomia ou punção	2 CLED e uma Gelose de Sangue e Sabouraud (se micológico)	Quantitativa (CLED, com uma ansa de 1 e de 10 µL, Sabouraud com uma ansa de 1 µL) Esgotamento do produto à superfície do meio sólido (Gelose de Sangue, com uma ansa de 10 µL)	35± 2° C, 24-48 horas - Meios CLED e Gelose de Sangue 25 ° C, 7 dias - Sabouraud

Tabela 2

Exame microscópico direto: No CHSJ os pedidos de análise bacteriológica e análise de urina tipo II são realizados em amostras diferentes, pelo fato de os setores se encontrarem fisicamente distantes (Microbiologia e Bioquímica Clínicas), sendo a análise microscópica do sedimento a fresco feita no Serviço de Bioquímica Clínica.

Interpretação de uroculturas: Após 18-24 horas de incubação os meios são observados para verificar se houve crescimento e se a cultura é valorizável ou não. Se não houver são re-incubadas. Se existir mais que uma colónia em cultura, é realizada uma repicagem de modo a ser devidamente isoladas (se bacilos de *Gram* negativos para MacConkey, se cocos de Gram positivo para gelose de sangue). Laboratorialmente os critérios mais usuais para a interpretação das uroculturas, apesar de cada laboratório doptar os próprios critérios, são apresentados na tabela 3. Relativamente ao resultado da urocultura em unidades formadoras de colónias (UFC) por mL de amostra, este é estimado com base no calibre da ansa (1 µL ou 10µL) e no número de colónias presentes na placa, sendo extrapolado para 1000 µL. (2)

Resultado da urocultura	Tipo de amostra e condições clínicas	Validação do resultado
≥10 ⁴ UFC/mL, até 2 patógenos diferentes	Urina obtida por micção/ Pielonefrite, cistite aguda, bacteriúria assintomática; obtida de doentes cateterizados.	Proceder aos testes de identificação e de suscetibilidade aos antimicrobianos.
≥10 ³ UFC/mL, só um patogénico	Urina obtida por micção/homens sintomáticos; urina obtida de doentes cateterizados; Síndrome uretral agudo.	Proceder aos testes de identificação e de suscetibilidade aos antimicrobianos.
Mais de 3 patógenos diferentes, sem predomínio evidente	Urina obtida por micção/ obtida de doentes cateterizados.	Sem significado clínico, amostra polimicrobiana, pedir nova amostra.
2-3 estirpes diferentes, com predomínio de uma e restantes < 10 ⁴ UFC/mL	Urina obtida por micção.	Proceder aos testes de identificação e de suscetibilidade aos antimicrobianos

<p>≥10² UFC/mL sem predomínio de nenhum tipo (a partir de ansas de 1 µL e 10 µL)</p>	<p>Amostra por aspiração suprapúbica (ou outras colheitas invasivas).</p>	<p>Proceder aos testes de identificação e de suscetibilidade aos antimicrobianos.</p>
---	---	---

Tabela 3

Após obtenção de colónias isoladas, geralmente em meios não seletivos, procede-se aos testes de identificação e de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos. Os patogénicos de interesse encontram-se no Anexo 3.

Secreções brônquicas, lavados brônquicos e broncoalveolares

Obtenção de amostras respiratórias pelos doentes: A expectoração ou secreções brônquicas é a amostra mais frequentemente recebida no laboratório para determinação do agente bacteriano causador de pneumonia. No entanto, geralmente é contaminada pelas secreções do trato respiratório superior (saliva) e, conseqüentemente, pela flora normal orofaríngea; afetando a sua qualidade. A amostra é colhida pelo próprio doente, por tosse profunda, mediante instruções específicas. Na impossibilidade de ser obtida (idosos e crianças que não consigam expectorar), a obtenção de amostras do trato respiratório inferior é realizada por broncofibroscopia. A vantagem de não ser uma técnica invasiva leva a que continue a ser muito usada.

Exame cultural: O exame bacteriológico é feito, em câmara de fluxo laminar (Nuair), recorrendo aos meios de cultura gelose de sangue, MacConkey e gelose de chocolate Polivitex, no entanto, no caso de as amostras serem provenientes de doente com Fibrose Quística também são semeadas em gelose de manitol salgado. Se houver exame micológico é feito em meio Sabouraud (mesma técnica que para os meios de cultura bacteriana). A sementeira das secreções brônquicas é feita por esgotamento do produto à superfície do meio com uma ansa de 10 µL, já os lavados são semeados quantitativamente recorrendo a uma ansa de 10 µL, tendo o cuidado de escolher sempre as zonas mais purulentas ou com sangue. Se o volume das amostras respiratórias for superior a 5 mL, estas são concentradas por centrifugação (2500 rpm/10 minutos), sendo utilizado o sedimento, quer para a cultura, quer para o exame microscópico. Os meios de cultura bacterianos são incubados a 35±2°C, em atmosfera de aerobiose, durante 24-48 horas; enquanto que o meio Sabouraud é incubado a 25±2°C, durante 7 dias (sendo verificados diariamente). Após 24 horas os meios são observados e caso haja crescimento e cultura valorizável são

encaminhados para os testes de identificação e de sensibilidades aos agentes antimicrobianos.

Exame microscópico direto após coloração de Gram: O exame microscópico direto permite avaliar a qualidade da amostra (número de células epiteliais, leucócitos e flora polimicrobiana), sendo realizados esfregaços de secreções brônquicas e lavados. Com a objetiva de pequena ampliação (x100) é feita a contagem do número de células epiteliais de descamação (que deve ser < 10 por campo). E com a de grande ampliação (x1000), a contagem de leucócitos polimorfonucleares (que devem ser superiores a 10-25 por campo, exceto nas neutropenias severas). É, também, importante verificar se há predomínio de população microbiana (ausência da flora normal do trato respiratório superior).

Interpretação das culturas: Na presença de colônias α -hemolíticas (gelose de sangue) é importante avaliar a presença de *Streptococcus pneumoniae*, através do teste de sensibilidade à optoquina, em gelose de sangue (sementeira por setores). O significado clínico dos resultados culturais dependem, não só dos métodos laboratoriais e normas, mas também da qualidade da amostra (colheita e transporte) e da clínica dos doentes. Os microrganismos patogénicos isolados mais frequentemente encontram-se no Anexo 4. ⁽²⁾

Fezes

Exame bacteriológico e micológico: Colheita de fezes pelo doente em contentor estéril sem conservantes, caso a partir da primeira não seja isolado o agente etiológico são pedidas mais duas amostras. Relativamente à temperatura de conservação e transporte, na suspeita de *Yersinia spp.*, as amostras têm de ser acondicionadas sob refrigeração (4°C) de forma a ser assegurada a viabilidade do microrganismo.

Exame cultural: O exame bacteriológico é feito utilizando os meios tetratonato (com adição de iodine), MacConkey, Salmonella Shigella, Campylosel e, ainda, Yersinia (a duas temperaturas) no caso desta pesquisa ser requisitada. Quanto às amostras provenientes da Unidade de Neutropénicos, a sementeira é realizada apenas nos meios de cultura MacConkey e D-Coccosel. Com exceção do meio tetratonato, em que a sementeira é feita por dispersão do produto nas paredes do tubo, os restantes meios são semeados pela técnica do esgotamento do produto à superfície do meio sólido com uma ansa de 10 μ L, assim como o meio de Sabouraud caso também seja

solicitado exame micológico. Os meios são incubados em condições diferentes, sendo resumidas na tabela 4 que se segue. Após 24 horas, os meios são observados para verificar se houve crescimento ou não de bactérias não fermentadoras de lactose, sendo feita a passagem do meio tetracionato para um novo meio Salmonella Shigella, permitindo uma maior recuperação das bactérias *Salmonella spp.* e *Shigella spp.*. As colónias supeitas (não fermentadoras de lactose e produtoras ou não de H₂S) são testadas por um conjunto de provas abordadas posteriormente nos testes de identificação bacteriana. Interessa, portanto, distinguir colónias não fermentadoras de lactose pois só interessam as espécies *Salmonella spp.* e *Shigella spp.*, pois as colónias de *Proteus spp.* apesar de não fermentadoras de lactose não são patogénicas.

Tipo de meio	Condições de incubação
Tetracionato, Salmonella Shigella e MacConkey	35±2° C, em aerobiose, 24-48 horas
D-Coccosel	35±2° C, atmosfera captofílica
Campyloesel	35±2° C, atmosfera microaerofílica, durante 72 horas
Yersinia	35±2° C, aerobiose, 24-48 horas Temperatura ambiente, 24-48 horas

Tabela 4

Atendendo à abundante flora polimicrobiana do cólon, o exame microscópico direto não é realizado. Relativamente à valorização dos isolados culturais das coproculturas, os patogénios mais frequentemente envolvidos nas infeções gastrointestinais são apresentados no Anexo 5.⁽²⁾

Exame parasitológico: O exame parasitológico de fezes é feito em câmara de fluxo laminar (Nuair) com base no Método de Ritchie Modificado - método de concentração por sedimentação mais usado. O objetivo principal desta técnica é a sedimentação e a concentração das amostras fecais para posterior pesquisa de ovos, quistos e larvas por exame microscópico direto a fresco ou com coloração Kinyoun modificada (*Cryptosporidium spp.* e *Isospora spp.*). Para a realização desta técnica é utilizado formol como conservante das estruturas parasitárias, NaCl para a realização da lavagem e, ainda, éter que é utilizado como solubilizante de gorduras e fibras presentes nas fezes (de modo a facilitar a observação ao microscópio). A centrifugação é muito importante, pois separa a amostra em 3 camadas distintas, o sedimento (objeto de estudo), formol (a intermédia) e o éter (mais superficial). O diagnóstico parasitológico baseia-se maioritariamente na morfologia das estruturas parasitárias. Durante o estágio tive a oportunidade de realizar a pesquisa de quistos

de *Giardia lamblia* por exame direto a fresco. Este exame consiste em colocar uma porção do sedimento obtido por concentração-sedimentação numa lâmina (com soluto de Lugol para corar as estruturas parasitárias) com uma lamela por cima. Com uma objetiva de pequena ampliação (x10), inicialmente é percorrida toda a área da lamela e quando for detetado uma estrutura suspeita (quistos de *Giardia lamblia*, ilustração 1) esta é focada com uma objetiva de maior ampliação (x40). O resultado deste exame permite estabelecer um diagnóstico definitivo. ⁽²⁾

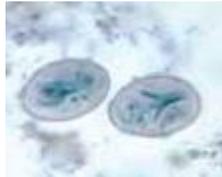


Ilustração 1

Ponta de catéter

Exame cultural: A sementeira de catéter é feita por rolamento em meio de cultura de gelose de sangue de modo a permitir um bom contacto entre o catéter e a superfície da gelose. O meio de cultura é incubado a 35 ± 2 ° C em atmosfera capnófila, durante 24-48 horas. Após 24 horas os meios são observados para verificar se houve crescimento (caso exista é avaliada a relevância clínica do isolado cultural e procede-se aos testes de identificação e de suscetibilidades aos agentes antimicrobianos, caso contrário as placas são reincubadas).

Interpretação das culturas: O isolado cultural só é valorizado se houver um crescimento superior ou igual a 15 colónias, sendo de valorizar todos os isolados obtidos pelo elevado risco de desenvolvimento de bacteriémias. O agente mais frequentemente isolado é o *Staphylococcus epidermidis* (por ser colonizador da pele), havendo outros que são apresentados no Anexo 3. ⁽²⁾

Líquido Cefalorraquidiano (LCR)

Exame cultural: A avaliação macroscópica (presença de sangue e/ou pús) e a concentração das amostras por centrifugação (1500g durante 15 minutos) precedem sempre a sementeira e o exame direto, devendo as amostras apresentar um volume superior ou igual a 5 mL (no máximo 10 mL). O LCR se não for processado de imediato deve ser conservado a 35° C ou à temperatura ambiente, de modo a ser

garantida a viabilidade dos microrganismos. Como a maioria das meningites bacterianas é causada por apenas um microrganismo, o número de meios de cultura a usar também é reduzido, sendo o exame bacteriológico do LCR efectuado em gelose de sangue, gelose de chocolate e caldo de chocolate. A sementeira do LCR é feita por esgotamento do produto à superfície do meio sólido (várias gotas do sedimento), com a utilização de uma ansa de 10µL, nos meios sólidos, e com a adição de 4 ou 5 gotas de líquido no caldo de chocolate. O exame micológico é feito por esgotamento do produto à superfície do meio sólido com uma ansa de 10µL, em gelose de Sabouraud. Os meios de cultura, com exceção do Sabouraud (25±2 ° C, durante 7 dias) são incubados a 35±2° C em atmosfera capnófila durante 24-48 horas. O Caldo de Chocolate é incubado 35±2° C em atmosfera de aerobiose, durante 24-48 horas. Os meios são vistos 24 horas após incubação, e reincubados caso não apresentem crescimento valorizável até 48 horas, enquanto que o meio Sabouraud é visto diariamente. Quando valorizáveis (Anexo 7), procede-se aos testes de identificação e de suscetibilidade aos antimicrobianos.

Exame microscópico direto: A coloração de Gram deve ser realizada em todos os sedimentos de LCR, com recurso a lâminas esterilizadas e desinfetadas com álcool, colocando uma gota na superfície da lâmina sem fazer extensão em toda a sua superfície (de modo a evitar a dispersão dos microrganismos). É importante reportar presença ou ausência de bactérias, células inflamatórias e eritrócitos. A coloração de Gram permite (pela morfologia das bactérias), juntamente com os dados clínicos do doente, gerar informação útil no diagnóstico presuntivo em cerca de 30 minutos após a receção da amostra. ⁽²⁾

Pús e exsudados

Exame cultural: Os pús e exsudados são colhidos com zaragatoas (de diferentes tipos consoante os agentes etiológicos) e enviados ao laboratório em meios de transporte adequados, para posterior exame cultural por esgotamento do produto à superfície do meio sólido. As placas são incubadas a 35±2°C, durante 24-48 horas em atmosfera capnófila, com exceção da gelose de Sabouraud que é a 25±2°C, durante sete dias. Após 24 horas de incubação os meios de cultura são observados, sendo reincubados se o crescimento for reduzido, senão são iniciados os testes de identificação e sensibilidade aos antimicrobianos; o meio Sabouraud é visto diariamente.

No Anexo 8 são apresentados os diferentes meios de cultura consoante o tipo de amostra, as condições de incubação e os agentes etiológicos de interesse. ⁽²⁾

Exame microscópico direto: No CHSJ só são realizados exames microscópicos diretos (após coloração de *Gram*) de exsudados de feridas e de exsudados vaginais. No caso dos exsudados endocervicais não é realizado porque o agente causal de maior interesse, *Neisseria gonorrhoeae*, quando observado intracelularmente não permite estabelecer diagnóstico clínico sem a realização de exame cultural (ao contrário do que acontece nos exsudados uretrais de homens sintomáticos). ⁽³⁾ Nas infeções vaginais e endocervicais o diagnóstico laboratorial é muito importante porque na maioria dos casos as mulheres são assintomáticas e estas infeções podem evoluir para situações de doença inflamatória pélvica conduzindo a problemas de fertilidade. Nos exsudados vaginais são procurados os agentes envolvidos nas vaginoses - a *Gardnerella vaginalis* (cocobacilos de Gram variável, curtos e tendencialmente posicionados nas células epiteliais de escamação designadas por *clue cell* com ausência ou redução dos *Lactobacillus spp.* presentes na flora normal) e nas vaginites – *Candida spp.* (fungo leveduriforme) e *Trichomonas vaginalis* (protozoário flagelado, devendo ser observado a fresco e de um modo rápido para se poder observar o movimento que lhe é característico).

Geralmente os exsudados apresentam características diferentes conforme os agentes envolvidos, sendo sumariamente apresentadas os principais aspetos a ter em consideração, na tabela 5. ⁽²⁾

Agentes etiológicos	Características do exsudado
<i>Gardnerella vaginalis</i>	Corrimento com “odor a peixe” (devido ao metabolismo de produtos bacterianos) associado a irritação perivaginal inferior à existente nas candidíases e tricomoníases.
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Corrimento esverdeado associado a prurido perivaginal.
<i>Candida spp. (Candida albicans)</i>	Exsudado branco e espesso, associado a eritema e prurido perivaginal.
<i>N. gonorrhoeae</i> e <i>C.trachomatis</i>	Exsudados endocervicais purulentos (abundantes polimorfonucleares)

Tabela 5

Hemoculturas

O sangue é um produto biologicamente estéril pelo crescimento bacteriano numa hemocultura indica, numa primeira leitura, uma bacteriémia, sendo da competência do laboratório e do médico avaliar o interesse clínico do agente isolado, isto é, considerá-lo patogénico ou contaminante (Anexo9). A sensibilidade e a interpretação dos

resultados da hemocultura dependem da informação clínica, da técnica da colheita (local da colheita e desinfecção) e, ainda do volume de sangue colhido (é crítico para o sucesso na deteção do agente causal, sendo que a maioria das bacteriemias apresenta um baixo número de unidades formadoras de colónias por mL, sendo crucial obter-se 10-20 mL nos adultos e 1-5 mL nas crianças).

Os frascos de hemocultura contêm meios de enriquecimento que diferem consoante o tipo de microrganismo que se pretende pesquisar (anaeróbios, aeróbios, fungos e micobactérias - Anexo 10), existindo ainda hemoculturas para amostras pediátricas. ⁽⁴⁾

Sistema BACTEC, Beckton Dickson Microbiology Systems: é um sistema automático que mede a produção de dióxido de carbono pelo metabolismo dos microrganismos (com base numa curva de crescimento exponencial), através de um sensor fluorocromo (presente no fundo do frasco de hemocultura) que emite fluorescência na razão direta da concentração deste gás. O dióxido de carbono dissocia-se no sensor e é dissolvido na água presente na matriz deste sensor, sendo gerados iões hidrogénio. Estes iões de hidrogénio levam à diminuição de pH que aumenta a emissão de fluorescência pelo sensor. Quando os frascos de hemoculturas chegam ao laboratório, primeiro procede-se à verificação da correta correspondência entre o pedido de análise (requisição) e o tipo de frasco de hemocultura. De seguida, as garrafas de hemocultura são colocadas no sistema *BACTEC*, onde são incubadas a 37 °C (2). De modo a garantir a qualidade dos resultados existem controlos de crescimento que asseguram a redução de falsos positivos. Para que haja um controlo rigoroso das hemoculturas, é efetuado registo em documento específico e no sistema informático; os resultados negativos são integrados automaticamente (com exceção dos negativos das hemoculturas das Micobactérias).

Em caso de positividade é feita uma passagem para meio sólido (gelose de sangue) e uma coloração de Gram (relatório preliminar para o médico). Quanto ao protocolo de incubação, este depende do tipo de hemocultura, isto é, da suspeita de um determinado microrganismo em particular, sendo referidos no Anexo I I. Se no final do protocolo de incubação o frasco apresentar sinais de positividade (sangue com cor de chocolate, abaulamento do septo, sangue lisado e/ou sangue com cor muito escura), deverá ser considerado como um positivo presuntivo. ⁽²⁾

Métodos de Identificação Bacteriana

Identificação de bacilos de Gram negativo: As bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* formam um grande grupo de bacilos Gram negativo, anaeróbios

facultativos, que fazem parte da flora normal do cólon dos seres humanos e de outros animais, no entanto, nos seres humanos, encontram-se em número relativamente baixo quando comparados com as bactérias anaeróbias presentes (por exemplo *Bacteroides sp*). Outra família com relevante significado clínico é a *Pseudomonadaceas*, cujos membros são bacilos Gram negativo semelhantes às enterobactérias do ponto de vista morfológico, no entanto, são aeróbios estritos. O membro mais importante desta família é a *Pseudomona aeruginosa* cujo principal habitat é o solo e a água podendo ainda encontrar-se como comensal do cólon. Dada a semelhança entre as famílias *Enterobacteriaceas* e *Pseudomonadaceas*, as colónias isoladas de bacilos de Gram negativo são diferenciadas pelo teste da oxidase, estando presente na ilustração 2 o fluxograma de trabalho para a identificação de bacilos de Gram negativo. Os testes são apresentados no Anexo 12. ⁽²⁾

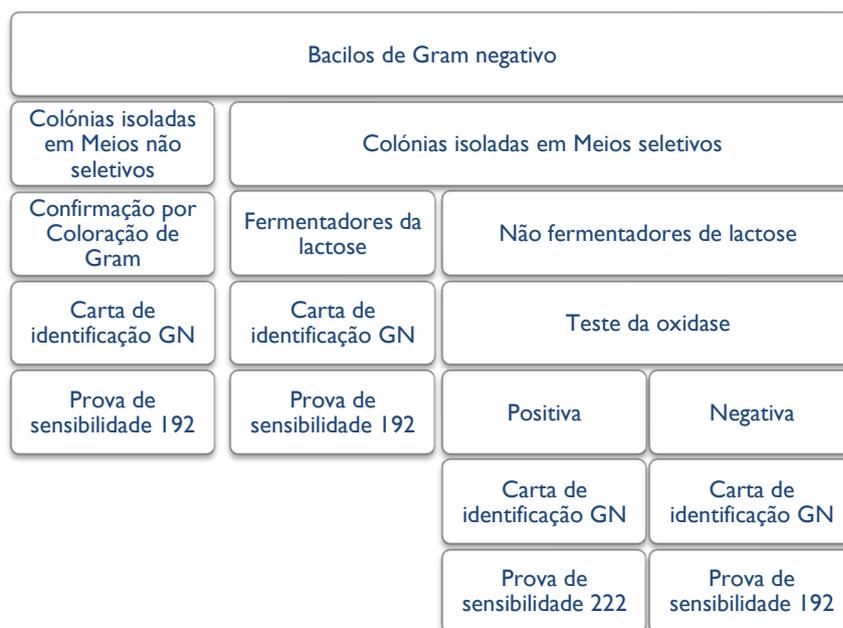


Ilustração 2

Identificação de cocos de Gram positivo: São bactérias com forma arredondada e imóveis (colónias com contorno bem definido). A família *Micrococcaceae* é constituída por vários géneros, sendo o *Staphylococcus* o mais importante em termos clínicos, nomeadamente, o *Staphylococcus aureus* (isolado da pele e mucosas). O *Staphylococcus aureus* pode ser responsável por várias infeções como pneumonia, intoxicação alimentar, síndrome do choque tóxico, endocardite e abscessos. O *Staphylococcus epidermidis* faz parte da flora normal da pele, podendo ser patogénico em situações de compromisso imunológico do hospedeiro. O

Staphylococcus saprophyticus, normalmente é comensal, podendo, no entanto, ser responsável por infecções do trato urinário em mulheres jovens. A família Streptococaceae é constituída pelo género *Streptococcus*, sendo classificados de acordo com a sua atividade hemolítica, propriedades imunológicas (classificação serológica de Lancefield) e resistência a fatores físicos e químicos. As espécies com relevância em termos de clínica, são as *Streptococcus pyogenes* (agentes etiológico da faringite estreptocócica, escarlatina, febre reumática e vários tipo de infecções da pele), *Streptococcus agalactiae* (meningite, sépsis puerperal) e *Streptococcus pneumoniae* (pneumonia pneumocócica). Os estreptococos do gupo D (atualmente classificados como *Enterococcus spp.*) fazem parte da flora gastrointestinal. A espécie *Streptococcus viridans* é comensal da flora do trato gastrointestinal e urogenital. A identificação das bactérias tem por base características morfológicas, culturais, bioquímicas e, ainda, através da estrutura antigénica. Na ilustração 3 encontra-se o fluxograma de trabalho para a identificação de cocos de Gram positivo, sendo apresentados no Anexo 13 os testes de identificação. ⁽²⁾

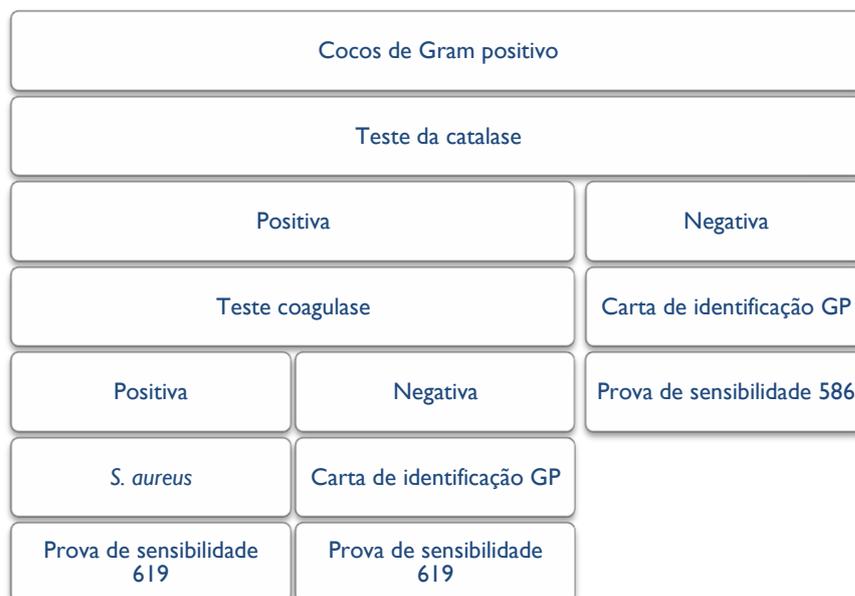


Ilustração 3

Outras provas de identificação microbiana (manuais). No Anexo 14 encontram-se outras provas de identificação microbiana. ⁽²⁾

Prova de identificação microbiana (Semiautomática)

Maldi-Vitek MS: É um sistema inovador e automatizado de identificação microbiana que utiliza a tecnologia MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionização Time-of-flight*) – espectrometria de massa. Através desta técnica é possível em poucos minutos fornecer uma clara identificação ao nível da espécie, género e família de um determinado microrganismo (bactéria e fungos). O sistema permite a identificação química de um determinado composto isolado, ou de diferentes compostos, gerando um espectro de massa, que por comparação com os espectros da base de dados do VITEK[®] MS (típicos de cada espécie) permite a identificação do microrganismo. O microbiólogo inocula 1 µL de colónia bacteriana (isolada) num poço do slide e 1 µL de matriz (ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico), deixando secar à temperatura ambiente. Para controlo de qualidade, é usada uma estirpe *Escherichia coli* ATCC, que é inoculada no poço de calibração (poço central entre cada grupo de 16 poços dos slides) ⁽⁶⁾

Vitek[®] 2: É um sistema totalmente automatizado que permite, com base no método de turbidimetria a identificação bacteriana ou fúngica através de Cartas de Identificação (Tabela 6). A densidade dos inóculos depende da etiologia do microrganismo, 3 McFarland para *Neisseria* spp e *Haemophilus* spp e 0,5 McFarland para as restantes bactérias e fungos, sendo preparados com uma solução NaCl 0,45%. Depois, as cartas e os inóculos são introduzidos no equipamento, no interior do qual são transportados para uma câmara de vácuo que permite a aspiração e dispensa dos inóculos nos poços da carta ⁽⁷⁾

Cartas de Identificação para VITEK [®] 2	
Carta GP	Identificação para bactérias Gram-positivo
Carta GN	Identificação para bactérias Gram-negativo
Carta NH	Identificação para <i>Neisseria</i> spp e <i>Haemophilus</i> spp
Carta YST	Identificação para fungos leveduriformes

Tabela 6

Testes de Sensibilidade aos agentes antimicrobianos

O objetivo principal destes testes é avaliar a suscetibilidade do agente etiológico aos antibióticos quando a sua resistência intrínseca for desconhecida.

Os métodos são classificados em fenotípicos e genotípicos, sendo a base dos primeiros a determinação da concentração mínima inibitória - concentração mais baixa que inibe o crescimento do microrganismo. Dentro dos métodos fenotípicos, estes são subdivididos em: quantitativos (no CHSJ é usado o E-test) e qualitativos (no CHSJ é usado difusão em disco pela técnica de Kirby-Bauer) e, ainda, métodos combinados Automatizados (VITEK® 2).⁽²⁾

E-test: É considerado o *método Gold standard* para a avaliação da suscetibilidade aos antibióticos, permitindo a determinação da concentração mínima inibitória. Uma tira de plástico, com um gradiente de concentrações pré-definidas do antibiótico e graduada, é colocada numa placa de agar Mueller-Hinton inoculada por sementeira em toalha (inóculo com a turvação 0,5 McFarland). A difusão do antibiótico no meio é imediata e, após incubação, observa-se uma elipse de inibição simétrica ao redor da fita, sendo determinada a CMI por leitura no ponto de interseção da tira e da elipse de inibição.⁽²⁾ A determinação da concentração mínima inibitória é realizada no diagnóstico laboratorial para confirmar resistências não esperadas de modo a dar uma resposta definitiva (resultados *borderline*), ou quando o método de difusão de disco não for adequado.⁽⁸⁾

Difusão em disco – Kirby-Bauer: É um método qualitativo que permite informar a categoria do isolado: sensível, suscetibilidade intermédia ou resistente.⁽⁵⁾ É versátil por permitir testar a grande maioria das bactérias patogénicas, incluindo as mais fastidiosas e a maioria dos antibióticos. Inicialmente é preparado um inóculo a partir de culturas puras de microrganismos com soro fisiológico com a densidade 0.5 McFarland. Depois, uma placa de agar Mueller-Hinton é inoculada pela sementeira em toalha e os discos de papel de filtro (contém antibiótico impregnado) colocados sobre o meio, no qual se difundem. Após a incubação são medidos os halos de inibição, sendo consultadas as tabelas de susceptibilidade (EUCAST) para determinar se o microrganismo se apresenta sensível, resistente ou com sensibilidade intermédia.⁽²⁾ Esta prova de suscetibilidade manual é efetuada quando o resultado no VITEK® 2 é inconsistente ou quando a carta de sensibilidade correspondente não exista.

Método automatizado Vitek® 2: O sistema Vitek® 2 da BioMérieux permite identificar os microrganismos isolados (por turbidimetria) e determinar a sensibilidade destes aos antibióticos selecionados (com base na origem da amostra e regime terapêutico do doente). As cartas de sensibilidade contêm antibióticos em concentrações variadas, desidratados e meios de cultura (Tabela 7). A carta do

sistema de teste de sensibilidade para Vitek® 2 Systems é uma metodologia baseada numa versão miniaturizada e abreviada da técnica de dupla diluição para as concentrações mínimas inibitórias determinadas pelo método de microdiluição. O inóculo (com densidade 3 de McFarland para *Neisseria* spp e *Haemophilus* spp e 0,5 McFarland para as restantes bactérias e fungos numa solução NaCl 0,45%) é introduzido automaticamente através de um tubo que preenche os 64 micropoços de plástico que apresenta concentrações específicas de antibióticos. As cartas são incubadas a temperatura controlada e o leitor ótico faz, a cada 15 minutos, leituras da luz transmitida por cada micropoço (existindo um micropoço para controlo de qualidade). O sistema de *software* faz a análise da cinética de crescimento, que é convertido depois em valores da CMI (concentração mínima inibitória). Os valores da CMI são depois validados pelo *software* AES (*Advanced Expert System*) sendo reportadas as resistências. ⁽⁷⁾

Cartas de Sensibilidade aos Antimicrobianos utilizados no VITEK® 2	
AST – 619	Carta utilizada para <i>Staphylococcus</i> spp
AST – 586	Carta utilizada para <i>Streptococcus</i> spp e <i>Enterococcus</i> spp
AST – 192	Carta utilizada para Enterobactérias
AST – 222	Carta utilizada para Não -Enterobactérias

Tabela 7

Micobactérias

O género *Mycobacterium* abrange 100 espécies diferentes, sendo algumas responsáveis apenas por infeções no Homem, enquanto que outras são isoladas a partir de amostras de animais, da água e do solo. No geral, as micobactérias podem ser divididas em dois grandes grupos mediante diferenças epidemiológicas e patogenicidade: complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) e as micobactérias não tuberculosas (de destacar *M. avium complex* nos HIV positivos), sendo responsáveis pela tuberculose, uma doença infecciosa que pode ser transmitida através de gotículas infetadas.

Laboratório das Micobactérias – O grupo das Micobactérias exige a manipulação de amostras e dos isolados culturais à parte atendendo ao elevado risco de exposição e contaminação (ilustração 4), pelo que o laboratório apesar de inserido no Setor da Microbiologia Clínica, encontra-se fisicamente separado com uma porta de vidro ventilante.

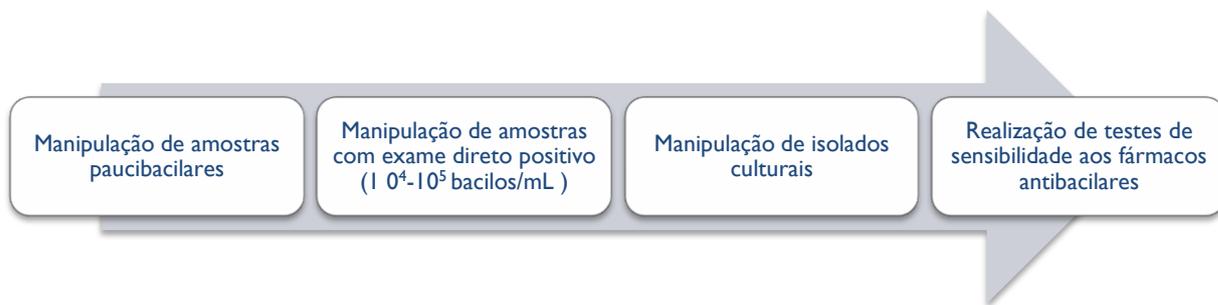


Ilustração 4

Diagnóstico laboratorial da infecção por Micobactérias. Atualmente o diagnóstico de micobacteriológico assenta no exame micobacteriológico, estando dependente do manuseamento cuidado da amostra e da rapidez no seu transporte. Apesar da baciloscopia permitir estabelecer um diagnóstico presuntivo rápido, o método *Gold standard* para o diagnóstico é o exame cultural da micobactéria, podendo demorar várias semanas. As técnicas da biologia molecular, reação em cadeia pela DNA polimerase (PCR), permitem fornecer informação preliminar ao clínico, no entanto os resultados têm de ser interpretados juntamente com o resultado do exame direto e cultural, para ser diferenciada a forma antiga da forma ativa da tuberculose. ⁽²⁾

Amostras biológicas. As secreções brônquicas são o produto mais frequentemente enviado ao laboratório, podendo ser obtidas pelo doente (mediante instruções) após tosse profunda, se necessário após indução com inalação de uma solução salina hipertónica (3-15%), ou após indução por broncofibroscopia; Aspirados gástricos utilizados geralmente em pediatria; Produtos extra-pulmonares - aspirados (incluindo pús), biópsias, urina e líquidos estéreis (sangue, líquidos pleural, pericárdico, peritoneal, cefalo-raquidiano e sinovial) e amostras invasivas - aspirado e biópsia de lesões suspeitas.

Processamento e tratamento das amostras. Conforme o tipo e condicionantes das amostras o tratamento que antecede a inoculação dos meios de cultura difere, sendo apresentados nas tabelas 8 e 9. ⁽²⁾

Condições das amostras	Respetivo tratamento
Muco (mucina)	Homogeneização/liquefação
Flora local associada	Descontaminação
Amostras paucibacilares/ diluídas (volume superior a 10 mL)	Concentração por centrifugação (3.000g x 15 minutos)
Acidez (ácido clorídrico presente no suco gástrico)	Neutralização

Tabela 8

Tipo de amostra	Respetivo tratamento
Expetoração, lavagens gástricas, lavados brônquicos e broncoalveolares	Homogeneização/liquefação Descontaminação Concentração
Urina	Descontaminação Concentração
Líquidos estéreis e tecidos de biópsias de órgãos profundos	Concentração por centrifugação
Sangue	Inoculado diretamente em BACTEC Myco F Lytic à cabeceira do doente

Tabela 9

No laboratório das Micobactérias do CHSJ, as amostras contaminadas por flora normal de crescimento rápido (com exceção das amostras com suspeita de presença de *Pseudomonas aeruginosa* em que o agente descontaminante é o ácido oxálico) e com presença de muco são processadas com o *BD BBL MycoPrep kit* (NaCl-NaOH – agente descontaminante e digestão).⁽²⁾ O kit possui um frasco com solução de hidróxido de sódio e citrato de sódio e uma ampola selada com N-acetil-L-cisteína (NALC). Contém ainda uma embalagem com tampão fosfato (que minimiza a toxicidade do NaOH e baixa a gravidade específica da amostra) em pó, com pH igual a 6,8 que é usado para preparar uma solução com água *ACCUGEN* usada em biologia molecular (esterilizada e desionizada). As amostras são então processadas de acordo com as instruções do kit, referidas na tabela 10 e na ilustração 5.

Tipo de mostras	Processamento
Saliva	BBL MycoPrep kit
Aspirado gástrico	Concentrar por centrifugação se volume superior a 10 mL. Resuspender sedimento em 5 mL de água estéril. BBL MycoPrep kit
Líquidos estéreis corporais	Concentrar por centrifugação se volume superior a 10 mL. Inocular o sedimento.
Tecidos	BBL MycoPrep kit
Fezes	Suspender 1 g de fezes em 5 mL Meio líquido Middlebrook, homogeneizar (vórtex) e usar o BBL MycoPrep kit

Tabela 10

Preparação do Tampão fosfato
• Autoclavagem (121° C, 15 min.)
Misturar a solução NaOH - citrato de sódio com o NALC (ampola)
• Num tubo de centrifuga (50 mL) verter a amostra e adicionar quantidade igual desta mistura (cerca de 10 mL de cada parte)
Liquefazer em vórtex
• Se amostra muito viscosa adicionar mais quantidade de NALC-NaOH • repousar à Tamb., 15 min
Controlo de esterilidade do tampão fosfato
• Com ansa de 10 µL numa Gelose de Sangue e incubar em estufa, 48 horas
Adicionar tampão fosfato (até perfazer os 50 mL)
Centrifugar (3000xg, 15 a 20 min.)
Decantar todo o sobrenadante
Adicionar 1 mL tampão fosfato e resuspender o sedimento
Verificar pH
• Adicionar cerca de 2 gotas de ácido sulfúrico até atingir pH neutro, à Tamb.
Realizar Controlo de esterilidade do tampão
• Com ansa de 10 µL numa Gelose de Sangue e incubar em estufa, 48 horas
Realização de esfregaços a partir da suspensão do sedimento e inoculação dos meios de cultura
• Coloração de Auramina e esfregaço para posterior oonfirmção dos positivos pela coloração de Kinyoun • Adicionar 0,5 mL ao meio líquido e 0,5 mL ao meio sólido se for o caso

Ilustração 5

Exame micobacteriológico direto, para pesquisa de B-A-A-R (bacilos ácido álcool resistentes) por técnicas de coloração ácido-álcool resistentes. É uma técnica rápida, de baixo custo e de fácil execução que desempenha um importante papel no diagnóstico presuntivo de tuberculose, na deteção de novos casos e na monitorização da resposta à terapêutica (pela carga bacilar). Apresenta como desvantagem a baixa sensibilidade e o fato de a positividade não permitir diferenciar o tipo nem a viabilidade bacilar, pelo que a positividade deve ser interpretada no contexto clínico epidemiológico antes de iniciar o tratamento empírico. O exame micobacteriológico direto baseia-se na resistência à descoloração por ácido-álcool da parede celular das micobactérias, por apresentarem um elevado teor em lípidos (ácidos micólicos). O método clássico é a coloração de *Ziehl-Neelsen* (coloração a quente), no entanto, o mais usado é o método de *Kinyoun*, por ser uma coloração a frio que através do aumento da concentração de fucsina fenicada permite o mesmo efeito. Os bacilos apresentam a cor vermelha, sendo observados no microscópio ótico com a ampliação de x1000. Podem ser executados exames diretos com recurso a colorações ácido-álcool resistentes com compostos fluorescentes,

nomeadamente a auramina fenicada que é retida inespecificamente pelos ácidos micólicos, conferindo coloração verde-amarelada às micobactérias, num fundo preto graças ao permanganato de potássio que inactiva as zonas com auramina não ligada à parede das micobactérias. A fluorescência permite aumentar o contraste e amplifica a capacidade de observação do operador, no entanto, só pode ser realizada em exames diretos após descontaminação e concentração (devido à fluorescência inespecífica) ⁽²⁾. A tabela 11 contém informação relativa às características das duas colorações ácido-álcool resistentes usadas no CHSJ.

Relativamente aos resultados do exame direto, dependendo da coloração os critérios diferem, sendo apresentados na tabela 12. ⁽¹¹⁾

Coloração	Corante primário	Corante de contraste	Álcool	Ácido	Temperatura	Sensibilidade	Especificidade
Kinyoun	Carbolfucsina a 3% (na ZN é a 0.3% com calor)	Azul de metileno	95%	Ácido clorídrico a 0.75%	A frio	10 ⁵ /mL	Superior à de Auramina
Auramina	Mistura de Auramina com fenol*	Permanganato de potássio (agente oxidante forte)	70%	Ácido clorídrico a 0.5%	A frio	10 ⁴ /mL	Menor que a de Kinyoun

Tabela 11

Fluorocromo Auramina		Kinyoun	Relatório
x250	x450	x1000	
0	0	0	B-A-A-R não visualizados
1-9 (10 campos)	2-18 (50 campos)	1-9 (100 campos)	1+
1-9 (por campo)	4-36 (10 campos)	1-9 (10 campos)	2+ (raros)
10-90 (por campo)	4-36 (por campo)	1-9 (por campo)	3+(alguns)
>90 (por campo)	>36 (por campo)	>9 (por campo)	4+(numerosos)

Tabela 12

Exame cultural: A escolha do meio de cultura para isolamento de micobactérias depende primariamente do tipo de amostra, devendo permitir o crescimento da micobactéria e inibir o crescimento de microrganismos que possam ter resistido à descontaminação. As amostras obtidas de locais estéreis podem ser diretamente inoculadas num meio não seletivo, com exceção de amostras de sangue que são inoculadas diretamente em *BACTEC Myco F Lytic* para hemocultura. O controlo de qualidade dos meios para crescimento de micobactérias é muito importante para garantir que os isolados de micobactérias sejam provenientes das

amostras clínicas. Importa referir ainda a necessidade de usar estirpes de referência ATCC para controlo positivo (micobactérias) e negativo (*Escherichia coli* ATCC 25922) dos meios, estabelecendo as mesmas condições de incubação das amostras clínicas. ⁽²⁾ No laboratório das Micobactérias do CHSJ, todos os produtos são semeados da seguinte forma:

- ❖ Produtos não estéreis e passagens de hemoculturas positivas - em meio líquido, *BD BBL MGIT, Mycobacteria Growth Indicator Tube 7 mL com BACTEC MGIT 960 Supplement kit* (incubação a 37°C);
- ❖ Produtos estéreis (exceto os provenientes da árvore brônquica) - 2 *BD BBL MGIT, Mycobacteria Growth Indicator Tube 7 mL com BACTEC MGIT 960 Supplement kit* (incubação a 25 e 37°C) e 2 *Löwenstein-jensen* (incubação a 25 e 37°C);
- ❖ Líquido ou biópsias pleurais - 2 *Löwenstein-jensen* e 1 *BD BBL MGIT, Mycobacteria Growth Indicator Tube 7 mL com BACTEC MGIT 960 Supplement kit* (todos incubados a 37° C).

Nas tabelas 13 e 14 são apresentadas as características principais dos meios referidos anteriormente.

	<i>Löwenstein-jensen</i>	Meio Líquido Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT), da Becton Dickinson
Composição do Meio	Base de ovo (azoto, ácidos gordos, proteínas e asparagina); glicerol (carbono) e verde de malaquite (agente de inibição).	Com composto fluorescente imprregnado no silicone (sensível ao oxigénio dissolvido no caldo)
Condições de Incubação	Durante as primeiras 48 horas: na posição horizontal (com a rosca semi-apertada), 37°C e CO ₂ a 5-10%; Até ao final de 60 dias - posição vertical (com a rosca totalmente apertada), 37°C e CO ₂ a 5-10%.	A 37 ° C no sistema semi-automático <i>BD BACTEC MGIT 960®</i> que monitoriza com base na emissão de fluorescência (relacionada com o crescimento bacteriano).
Monitorização	Semanal - por observação macroscópica e exame direto (<i>Kinyoun</i>)	
Resultado	Positivo/Negativo (n°. colónias).	Positivo (por emissão de sinal sonoro) Negativo (ao fim de 42 dias e após confirmação por exame direto).

Tabela 13

	<i>BD Frascos de Cultura BACTEC Mycol F Lytic</i>
Composição do Meio	Meio de cultura não seletivo - meio líquido de Middlebrook 7H9 e de infusão Cérebro Coração para o isolamento de micobactérias a partir de amostras de sangue
Condições de Incubação	37° C (protocolo - 42 dias de incubação)
Monitorização	Ver Sistema <i>BACTEC</i> das hemoculturas (página 20)
Resultado	

Tabela 14

Relativamente ao procedimento de integração dos resultados do exame cultural, a ilustração 6 esquematiza todos processos inerentes.

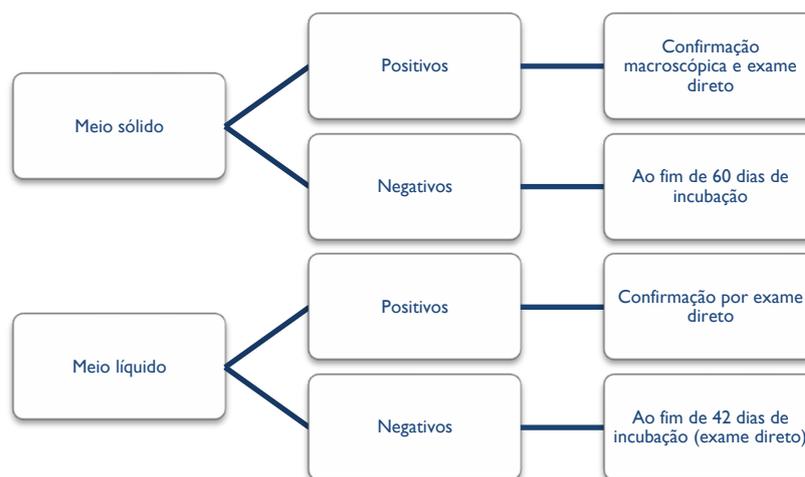


Ilustração 6

As vantagens e desvantagens dos diferentes meios de cultura estão sistematizadas na tabela 15.⁽⁹⁾

Exame Cultural	Vantagens	Desvantagens
Meio sólido Löwenstein-jensen	Permite quantificar as colônias	Crescimento mais lento
Meio líquido não radiométrico BACTEC MGIT 960	Deteção mais rápida que o "gold standard" (BACTEC 460 system) Não radiométrico (recurso à fluorescência)	Contaminação (maior positividade com amostras inquinadas)
Meio líquido radiométrico BACTEC 460 system	Menor taxa de contaminação que o método fluorimétrico	Radiométrico

Tabela 15

Na tabela 16 encontra-se informação relativa à sensibilidade, especificidade, necessidade da viabilidade dos bacilos e a rapidez de cada método de diagnóstico.⁽⁹⁾

Método	Sensibilidade*	Especificidade*	Necessidade da viabilidade dos bacilos*	Rapidez
Exame direto por Kinyoun	10 ⁵ bacilos/mL de amostra	Superior à por fluorescência	Independente	Rápido
Exame direto por Auramina	10 ⁴ bacilos /mL de amostra	Inespecífica	Independente	Rápido
Cultural	10-100 bacilos/mL amostra	Inferior à da PCR	Dependente	Lento (mínimo 2-4 semanas)
PCR	< 10 bacilos/ mL amostra	Elevada para <i>M.tuberculosis</i> complex	Independente	24-48 horas

Tabela 16

Identificação por sondas de DNA dirigidas ao RNA ribossômico das Micobactérias: No Laboratório da Micobactérias do CHSJ são usadas sondas moleculares (reação de hibridação) para deteção do ácido ribonucleico do MT (*Accuprobe*®) ou na

amplificação do ácido desoxirribonucleico *Genotype*®), para identificação do complexo *M. tuberculosis* antes da realização dos testes de sensibilidade aos antibióticos. ⁽²⁾

Accu-PROBE *Mycobacterium tuberculosis* complex culture identification test: É um teste rápido (inferior a 1 hora) baseado na técnica de hibridação de ácidos nucleicos com sonda de DNA, para a identificação de *M. tuberculosis complex* a partir de meios sólidos ou líquidos, ou a partir de produtos obtidos por Reação de Amplificação. ⁽¹³⁾ O sistema AccuProbe usa uma sonda de DNA de cadeia simples complementar com o RNA ribossomal do *M. tuberculosis complex*, marcada com um composto quimioluminescente (éster de acridina), empragnada nas paredes do tubo correspondente. A tabela 17 explica os principais aspetos associados a cada etapa do processo, sendo posteriormente apresentado em esquema as etapas detalhadas.

Preparação da amostra	Obtenção do pellet micobacteriano. Se apresentar cor branca é sugestivo de <i>M. tuberculosis complex</i> , caso seja laranja é característico das espécies atípicas.
Extração dos ácidos nucleicos (tubo de lise)	Obtenção dos ácidos nucleicos através do agente de lise, do banho de ultrassons e das esferas presentes no tubo de lise e do choque térmico 95°C ± 5°C
Reação de hibridação (tubo com sonda)	Obtenção de híbridos
Seleção híbridos formados	Seleção através da solução tampão (reagente de seleção), que permite eliminar a sonda não ligada
Leitura e Interpretação	Leitura da quantidade de híbridos formados através do luminómetro. As amostras são positivas para <i>M. tuberculosis complex</i> quando as unidades de luz relativa (RLU) forem superiores a 30,000, caso contrários não está presente este complexo.

Tabela 17

Geno Type *Mycobacterium* CM/ AS:

Este ensaio conjuga duas técnicas: a de amplificação do produto cultural por reação de PCR e a de reação de hibridação reversa (3'→5') dos produtos amplificados em tira de nitrocellulose com sondas imobilizadas para diferentes espécies de micobactérias.

O *Geno Type Mycobacterium CM* é um teste qualitativo de genética molecular para a identificação de *common Mycobacteria* com maior interesse para a clínica, incluindo sondas para *M. tuberculosis complex*, membros do *M. avium complex*, *M. kansasii*, e *M. chelonae*, enquanto que o *Geno Type Mycobacterium AS* possibilita a identificação de espécies que são encontradas menos frequentemente, como a *M. simiae*, *M. mucogenicum*, e *M. celatum*.

No CHSJ, a identificação do isolado cultural é iniciada com o primeiro painel (*Geno Type Mycobacterium CM*), caso não ocorra hibridação, ou não seja possível identificar a micobactéria pelo padrão de bandas obtido, é realizado o segundo painel (*Geno Type Mycobacterium AS*) com mesmo produto amplificado. Na tabela 18 encontram-se sumariadas as etapas deste teste. ⁽¹⁰⁾

Extração DNA	Centrifugar 1 mL meio líquido MGIT (5 min., 14500 rpm) Ressuspender o sedimento. Lisar a parede micobacteriana: 20 min. a 95°C, e posterior banho de ultrassons. Centrifugar (5 min., 14500 rpm). Transferir 5 µL sobrenadante para eppendorf.
Amplificação multiplex com primers biotinizados*	PCR em termociclador normal (desnaturação, emparelhamento e amplificação). Kit com mistura de <i>primers</i> e nucleótidos, tampão de amplificação, cloreto de magnésio, Taq polimerase termoestável e suspensão inativadora de calor. Nota: o Mix PCR apresenta coloração rosa porque os volumes a adicionar são muito reduzidos e permite controlar o procedimento.
Hibridação reversa	Desnaturação química dos produtos amplificados. Hibridação dos amplicons às sondas de DNA, marcadas com biotina, imobilizadas na membrana de nitrocelulose. Lavagem. Adição de Streptavidina ligada à enzima fosfatase alcalina. Adição do substrato - Reação cromogénica mediada pela fosfatase alcalina. Lavagem final. Secagem das tiras e interpretação.

Tabela 18

Teste de sensibilidade aos antibióticos antibacilares: No Laboratório das Micobactérias do CHSJ o teste de sensibilidade aos fármacos antibacilares é realizado por um método não radioativo e qualitativo rápido que compreende a avaliação dos fármacos estreptomina, etambutol, isoniazida, rifampicina e pirazinamida, através do *BD BACTEC MGIT 960-SIRE-Kit* e do *BD BACTEC MGIT 960-PZA-Kit*, sendo incubados e monitorizados no sistema *BACTEC MGIT 960*. Estes baseiam-se no crescimento de isolados de micobactérias, previamente identificadas, num tubo contendo fármaco numa concentração prédefinida e correlacionável com a estabelecida para a terapêutica, que é comparado com um tubo isento de fármaco (contolo do crescimento). A análise da fluorescência no tubo contendo fármaco, comparativamente com a fluorescência presente no tubo de controlo de crescimento, é usada pelo instrumento para determinar os resultados da sensibilidade. O equipamento *BACTEC MGIT 960* interpreta estes resultados automaticamente e reporta-os como sensível ou resistente. Para que o ensaio seja validado os controlos de crescimento têm de atingir as 400 unidades de crescimento, no caso do controlo do SIRE durante 4º-13º dias (*BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE Kit For the Antimycobacterial Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis*), no controlo da pirazinamida durante 4º-21º dias (*BACTEC™ MGIT™ 960*

PZA Kit For the Antimycobacterial Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis); sendo o resultado para cada antibiótico reportado mediante um cutoff para as unidades de crescimento de 100, como sensível ou resistentes caso as unidades de crescimento sejam inferiores ou superiores respetivamente.

Testes rápidos para deteção de antígenos - imunodiagnóstico

Os testes rápidos imunocromatográficos são frequentemente utilizados na rotina do laboratório de Microbiologia Clínica na deteção de antígenos (de superfície ou solúveis) bacterianos, víricos ou de parasitas. Razão principal da sua aplicação é a rapidez, facilidade de execução e o baixo custo com que permitem gerar dados preliminares com interesse clínico para o diagnóstico de infeções. Apresentam também, precisão, facilidade de interpretação dos resultados e um processamento mínimo da amostra. ⁽²⁾ Na tabela 19 são apresentados os tempos médios de execução dos métodos cultural e imunoenzimático, provas de identificação dos isolados e respetivos testes de sensibilidade antimicrobiana; estabelecendo uma comparação com a duração dos testes rápidos imunocromatográficos.

os. ⁽¹⁰⁾

Cultura microbiana	24-72 horas
Testes de identificação dos isolados culturais	4-24 horas
Teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos	24 horas
ELISA (Enzyme Ligand Immunoassay)	2-4 horas
Testes rápidos imunocromatográficos	Desde minutos a 1-2 horas

Tabela 19

Princípio dos Testes rápidos imunocromatográficos: os testes rápidos imunocromatográficos são fornecidos no formato de cassetes com tira de nitrocelulose, impregnada por anticorpos específicos anti-antígeno alvo, na zona da banda do teste e anticorpos anti-anticorpo marcado com composto cromogénio (adicionado numa fase posterior) na zona da banda do controlo. Na porção terminal da cassette, numa depressão em plástico ou mesmo na tira de nitrocelulose é adicionado um conjugado (anticorpo marcado com uma molécula cromogénia que apresenta afinidade com o anticorpo na zona da banda do controlo). A amostra ao ser adicionada primeiro que este conjugado, se tiver o antígeno alvo, este vai-se ligar ao anticorpo na zona da banda teste e o conjugado depois quando adicionado liga-se na zona da banda de controlo, independentemente do antígeno alvo estar ou não presente na amostra (o que permite validar o teste). Apesar de rápidos e exatos, precisam sempre de ser complementados por testes confirmatórios.

Kits disponíveis no Sector da Microbiologia Clínica do CHSJ: Pesquisa na urina - Antígeno *Streptococcus pneumoniae* (Binax NOW® da Alere) e Antígeno *Legionella pneumophila* (BinaxNOW® da Alere); Pesquisa em sangue total em EDTA - BinaxNow® Malária e Pesquisa em fezes - Antígeno Rotavírus e Adenovírus (Combi-Strip® da Coris)

Imunodiagnóstico - Detecção de antígenos por imunofluorescência

Na escolha do fluorocromo é tido em consideração o microrganismo e o método microscópico em causa, sendo o fluorocromo mais comumente usado em imunofluorescência o isotiocianato de fluoresceína - FITC (fluorescência verde e intensa) (2).

Marcação por imunofluorescência. Conjuga a especificidade associada à reacção antígeno-anticorpo entre o anticorpo específico de uma determinada espécie de microrganismos marcado com o fluorocromo e o antígeno da espécie do microrganismo alvo, com a amplificação de contraste graças à fluorescência. Em imunofluorescência, tal como nos ensaios imunoenzimáticos as etapas de lavagem são muito importantes para garantir que o anticorpo, conjugado com o fluorocromo, se ligue apenas ao antígeno alvo e que a detecção final por emissão de fluorescência se deva somente a esta, evidenciando a presença do microrganismo pesquisado.

Imunifluorescência específica e inespecífica. No diagnóstico com base em imunofluorescência é muito importante saber diferenciar a fluorescência específica da inespecífica pois esta pode gerar falsos positivos principalmente em amostras com flora microbiana associada, muco e leucócitos. Enquanto que a fluorescência específica é observada dentro das células alvo do microrganismo, a inespecífica é observada num plano superior, fora das células.

Imunofluorescência direta e indireta. Na imunofluorescência direta é usado um anticorpo IgG anti antígeno alvo (espécie do microrganismos pesquisado), marcado com o fluorocromo. Esta técnica apresenta maior rapidez (realizada num só passo) relativamente à imunofluorescência indireta que compreende duas etapas e, ainda, menor imunofluorescência inespecífica (maior especificidade). Na imunofluorescência indireta, na primeira etapa é adicionado um anticorpo anti antígeno alvo não marcado (da espécie do microrganismo pesquisado), na segunda adiciona-se um anticorpo anti imunoglobulina IgG marcado com fluorocromo (anticorpo primário) que se liga ao primeiro, localizando o alvo antígeno através da fluorescência. A imunofluorescência indireta apresenta maior sensibilidade, por amplificação do sinal, no entanto aumenta a fluorescência inespecífica (perde especificidade). Outro aspeto a ter em consideração é o grau de pureza dos

anticorpos monoclonais usados, pois quanto maior, melhor são a sensibilidade e especificidade do método de imunofluorescência.⁽²⁾

Controlo da qualidade em Imunofluorescência. Em imunofluorescência os resultados são sempre interpretados em relação a um controlo negativo e positivo em paralelo com o teste.

Processamento das amostras para pesquisa de antígenos por Imunofluorescência. No Serviço de Microbiologia Clínica do CHSJ a imunofluorescência é usada como método de detecção de antígenos de microrganismos com isolamento cultural difícil ou lento, no caso da *Legionella pneumophila* e do fungo *Pneumocystis jiroveci* e ainda como método de detecção rápido de infeções víricas pelos vírus do trato respiratório (Adenovírus, Influenza A e B, Parainfluenza 1, 2 e 3, Metapneumovírus e Sincicial), CMV e HSV 1 e 2. A imunofluorescência é um método útil por conciliar a especificidade e reproductibilidade dos anticorpos monoclonais com a simplicidade e rapidez das técnicas. Desta forma, a detecção direta de antígeno por imunofluorescência pode ser realizada como um método de rastreio das amostras de doentes, através de um painel de anticorpos para múltiplos vírus. Este rastreio é particularmente útil em pediatria, na detecção de vírus respiratórios (elevado número de partículas virais), por apresentar elevada sensibilidade. A imunofluorescência apresenta ainda a vantagem de permitir fazer o diagnóstico mesmo na ausência de anticorpos na fase aguda da doença e, principalmente, nos lactentes e imunodeprimidos em que os níveis de anticorpos são baixos ou indetectáveis. No caso da *Legionella pneumophila*, como o isolamento cultural é difícil e lento, a imunofluorescência permite obter resultados confirmatórios após rastreio de amostras de urina de doentes por testes rápidos imunocromatográfico, de um modo mais célere e menos dispendioso face às técnicas de biologia molecular (usada no caso de serem obtidos resultados positivos na detecção antigénica por imunofluorescência). Relativamente ao *Pneumocystis jiroveci*, no CHSJ apenas são realizadas dois tipos de metodologias, detecção antigénica de quistos por imunofluorescência e reação de PCR. Na tabela 20 são apresentados o tipo de amostras e o respetivo tratamento conforme o agente etiológico pesquisado.

Amostras com pedido específico de exame virológico	
Sangue total	Pesquisa de CMV
Secreções brônquicas e aspirados nasofaríngeos	Pesquisa de vírus respiratórios (Adenovírus, Influenza A e B, Parainfluenza 1, 2 e 3 e sincicial e metapneumovírus). No caso de se tratarem de amostras provenientes da Pediatria Oncológica pesquisar também os vírus HSV 1 e 2 e CMV
Lavados brônquicos e broncoalveolares, aspirados pulmonares e líquidos pleurais	Screening para pesquisa de vírus respiratórios (Adenovírus, Influenza A e B, Parainfluenza 1, 2 e 3 e sincicial), HSV 1 e 2 e CMV. No caso do screening ser positivo, efetuar a pesquisa dos vírus respiratórios individualizada
Raspados ou exsudados de lesões	Pesquisa de CMV, HSV 1 e 2.
Amostras do trato respiratório com pedido específico de exame não virológico	
Pesquisa de <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pesquisa de <i>Legionella pneumophila</i>	
Processamento das amostras	
Sangue total colhido em tubo de hemograma com EDTA	
Separação dos leucócitos por sedimentação dos eritrócitos com dextrano e centrifugação a baixas rotações	Homogeneização da amostra por inversão Transferir a amostra para tubo de centrifuga Adicionar dextrano, incubar 20 minutos a 37 ° C na posição vertical Transferir o sobrenadante (Buffy coat) para novo tubo de centrifuga Adicionar tampão PBS ao sobrenadante Centrifugar a 1500 rpm/10 minutos Descartar por inversão o sobrenadante Lisar os eritrócitos vestigiais presentes no sedimento: Adicionar reagente de lise, vortexar, choque térmico durante 10 minutos no congelador Adicionar tampão PBS ao sedimento e centrifugar 1500 rpm/10 minutos Obtenção de pellet branco (leucócitos)
Contagem diferencial leucocitária	Em Contador de células Sysmex XE-2100D ou XE-5000
Obtenção de suspensão leucocitária com densidade standarizada 2000 leucócitos/ μ L	Diluir ou concentrar de modo a obter a densidade pretendida
Efetuar esfregaço	20 μ L / poço
Secar a 37 ° C	
Fixação e permeabilização	Fixar a amostra com formaldeído, lavar com solução de lavagem (1% de soro fetal bovino em tampão PBS), Permeabilizar a membrana dos leucócitos para permitir a entrada dos anticorpos (com solução do kit) e lavar novamente com a mesma solução de lavagem
Amostras do trato respiratório	
Tratamento da amostra, considerando o volume, presença de muco, flora associada e sangue	Concentrar por centrifugação 3000 rpm/10 minutos se volume se > 2 mL: Lavar com tampão PBS/água estéril* e fluidificar com NALC se muito espessa/com muito sangue – no caso das secreções brônquicas principalmente Diluir com tampão PBS ou água estéril* a amostra (diluição 1:2) se volume entre 1-2 mL: *P, jirovecii
Homogeneizar	Pipeta de Pasteur e vórtex
Transferir para tubo de centrifuga	
Centrifugar	A 3000 rpm/10 minutos
Rejeitar o sobrenadante	Homogeneizar o sedimento ao vórtex - ficando apenas 1 mL de modo a assegurar produto suficiente caso seja necessário efetuar novo teste. Quando a transparência do produto não permitir a separação com obtenção de sedimento, fazer logo homogeneização por vórtex sem rejeitar produto.

Efetuar esfregaço	Vírus respiratórios <ul style="list-style-type: none"> Adicionar 20 µL de amostra em cada poço, nas posições 1- Adenovírus, 2 e 3- Influenza A e B, 4,5 e 7- Parainfluenza 1, 2 e 3, 9- Metapneumovírus e 11- Sincicial <i>L. pneumophilla</i> <ul style="list-style-type: none"> Adicionar 20 µL de amostra em duplicado (Lâmina com dois poços) <i>P.jirovencii</i> <ul style="list-style-type: none"> Adicionar 20 µL de amostra em duplicado (Lâmina com dois poços)
Secar a 37°C	
Fixar	Com acetona, 10 minutos
Raspados ou exsudados de lesões	
Vêm já colhidos em lâminas, não necessitam de preparação da amostra	

Tabela 20

Critérios para interpretação da imunofluorescência. Devem existir critérios *standard* para a interpretação da intensidade de fluorescência, bem como relativos ao reconhecimento morfológico das inclusões virais. Na tabela 21 encontram-se os principais padrões de fluorescência.

Microrganismos	Padrão de fluorescência
Vírus Influenza, adenovirus e herpes vírus	Marcação nuclear/ núcleo-citoplasmática (dependendo da estirpe e estado de infecção) – inclusão fluorescente granular.
Vírus respiratórios sincicial e parainfluenza	Marcação citoplasmática - inclusão fluorescente granular. Os vírus sincicial rebentam as células que infetam e a fluorescência apresenta-se como um pontuado que parece que sai das células.
Metapneumovirus	Intracitoplasmática – inclusão fluorescente granular grossa e uma espécie de nucléolos.
<i>P. jirovencii</i>	Fluorescência translúcida, oocistos apresentam forma semelhante a azeitona, podendo alguns assemelharem-se às bolas de basebol, formando <i>clusters</i> .
<i>L. pneumophilla</i>	Bacilos verde fluorescente, num fundo vermelho.
CMV	Nuclear, podendo estender-se ao citoplasma das células Polimorfonucleares.

Tabela 21

Serologia

Os métodos imunoquímicos usam antígenos e anticorpos como ferramentas para detecção de microrganismos.

Os métodos serológicos de rotina são desenhados essencialmente para o doseamento ou pesquisa das classes de anticorpos IgG e IgM. As imunoglobulinas IgM são produzidas como resposta primária aos antígenos, apesar de os níveis permanecerem elevados de um modo transitório, indicando uma infecção ativa ou recente. Já as IgG podem persistir por longos períodos após o curso da infecção.

Indivíduos imunocompetentes produzem IgM e IgG em resposta à maioria dos patógenos. Geralmente a IgM é produzida após o primeiro contacto com o patógeno tornando-se indetetável num curto período de tempo, enquanto que as IgG geralmente conferem imunidade. Outro aspecto importante é a determinação do título de anticorpos, que é a diluição mais elevada do soro de doentes em que o anticorpo ainda é detetável. Numa fase aguda os títulos são cerca de 4 vezes superiores aos observados numa fase de convalescência, sendo importante a colheita de amostras nestas duas fases. ⁽²⁾

Técnicas usadas no Serviço de Serologia do CHSJ. As técnicas de serologia são baseadas em reações antígeno-anticorpo, sendo umas manuais e outras em sistemas automatizados. A garantia da qualidade é transversal a estas técnicas com recurso a controlos positivos e negativos e calibradores para construção de curvas de calibração nos diferentes *softwares* dos equipamentos disponíveis, participando no programa de garantia de qualidade externa UK NEQAS, mensalmente.

Testes rápidos imunocromatográficos – estes testes permitem a deteção qualitativa de anticorpos, através da imobilização de antígenos na zona que corresponde à linha do teste. A amostra, migra cromatograficamente, até alcançar esta zona dos antígenos, ocorrendo a ligação antígeno-anticorpo, que é detetada pelo aparecimento de cor. ⁽²⁾

Pesquisa de Anticorpos Heterófilos na Mononucleose Infeciosa – os testes serológicos permitem o diagnóstico de Mononucleose Infeciosa provocada pelo vírus Epstein-Barr (EBV), uma vez que o isolamento do vírus não é executado na prática laboratorial e os anticorpos aparecem num período de tempo bem definido após a infeção primária. O diagnóstico é estabelecido pela clínica e idade do doente e pela presença de anticorpos heterófilos da classe IgM. Contudo estes não positivam em crianças e idosos, sendo importante a pesquisa de outros anticorpos anti: antígenos precoces - EA, antígenos cápside virais - ACA e antígenos nucleares Epstein-Barr – EBNA. ⁽²⁾

Provas manuais

Reações de aglutinação: Reação Rose Bengal - permite a deteção de anticorpos contra a Brucela, de fase aguda ou crónica, sendo uma boa técnica em lâmina de screening para Brucelose. Se as amostras positivarem é feita a quantificação pela reação de WRIGHT (título), que é um teste quantitativo de aglutinação em microplaca (microELISA), com várias diluições e um controlo positivo (geralmente uma amostra positiva de um doente com brucelose) que permite saber a maior diluição que positiva; Reação de WIDAL - teste semi-quantitativo de aglutinação em tubo para deteção de anticorpos anti-salmonella; são usados os antígenos de

Salmonella typhi (antígenos flagelares-TH e somáticos – TO) e de *Salmonella paratyphi* (antígenos flagelares - BH e somáticos- BO). Pode haver aglutinação em amostras de doentes com outras infeções devido a reatividade cruzada ou imunização prévia.

Reação de floculação: VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) – teste não-treponémico qualitativo e semi-quantitativo para a detecção de anticorpos anti-cardiolipina (reaginas), por reação de floculação em lâmina de vidro. A sífilis é uma doença sexualmente transmissível provocada pela espiroqueta *Treponema pallidum* e é diagnosticada primeiramente por serologia. A infeção por esta bactéria induz uma resposta imunológica caracterizada pela produção de anticorpos anti-treponémicos e não treponémicos.

A VDRL apresenta-se particularmente útil no seguimento da resposta ao tratamento em doentes com infeção ativa, sendo feito em amostras com reatividade no teste treponémico (imunoensaio com deteção final em quimioluminescência), com base no algoritmo reverso. Caso o teste VDRL seja positivo é feita a determinação do título. Este rastreio pelo algoritmo reverso apesar de automatizado, levanta problemas de interpretação dos resultados, principalmente quando há discordância entre testes treponémicos e não-treponémicos. Neste sentido o teste confirmatório permite diferenciar a situação de sífilis tratada com sucesso da doença latente/tardia, por *Western blot*.⁽¹⁾

Western blot: Os antígenos do microrganismo patogénico são separados por eletroforese e vão migrando conforme o seu peso molecular em gel, cujas bandas são posteriormente transferidas para membranas de nitrocelulose. Se a amostra do doente tiver anticorpos, estes vão-se ligar a estes antígenos. Sendo esta ligação revelada numa segunda fase pela adição de anticorpos anti-IgG e anti-IgM humanas (conjugado) e de substrato (solução de NBT/BCIP - nitro-azul tetrazólio e 5-bromo-4- -3'-indolfosfato), aparecendo como bandas coradas de escuro na tira de nitrocelulose. A leitura é feita através de um *scanner* ou por intermédio de uma tira controlo.⁽²⁾

Automatização em Serologia: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA):

Enzyme Linked Fluorescent Assay (ELFA): O equipamento VIDAS (*Vitek Immuno Diagnostic Assay System*) da Biomerieux possui uma técnica que combina o método ELISA com uma leitura final em fluorescência. A enzima usada para a gama VIDAS é a

fosfatase alcalina e o substrato o 4- metil umbeliferil fosfato (4-MUP) que é hidrolisado em 4-metil umbeliferona (4-UM) que tem a propriedade de reemitir a luz a 450 nm após excitação a 370 nm. Os kits comerciais estão apresentados na forma de barrete, que contém vários poços e um cone que funciona de matriz de reação e pipeta. Numa primeira fase, a amostra que é colocada no primeiro poço é aspirada pelo cone para o poço seguinte onde é diluída e tamponizada. Posteriormente ocorre a reação com o conjugado (antigénio marcado com a fosfatase alcalina), e o excedente que não ligar é retirado através de uma etapa de lavagem. De seguida é adicionado o substrato da enzima, e o produto final é excitado e detetada a luz de emissão deste, sendo dada em valores de fluorescência relativa. Depois por extrapolação da curva de calibração é emitido um resultado quantitativo.

1. Sistema MicroELISA – Mago IFA Plus, da Erba® Diagnostics: os testes efetuadas neste equipamento são realizados por um ensaio de MicroElisa para a pesquisa semiquantitativo de anticorpos no soro.
2. Multiplex flow immunoassay (MFI) - Bio-Plex® 2200 Multiplex Immunoassay Systems da Bio-Rad. É um sistema que concilia o método de ELISA com citometria de fluxo. As amostras são aspiradas para microtubos de reação que contém microesferas magnéticas revestidas por proteínas recombinates dos agentes etiológico em estudo (antigénios) e diluente da amostra. Após um período de incubação e lavagem é adicionado anticorpo anti imunoglobulina humana, o qual é marcado com ficoeritrina (fluorocromo). Após novo ciclo de incubação e lavagem é efetuada uma leitura de fluorescência em intensidades relativas de fluorescência que por comparação com um padrão interno é convertido em rácio de fluorescência. Este depois por extrapolação da curva de calibração permite determinar a concentração do anticorpo na amostra (antibody index units), sendo um resultado quantitativo. Os diferentes níveis de controlos da qualidade usados permitem fazer uma leitura de fluorescência de base, avaliar a integridade da amostra e minimizar a interferência das ligações inespecíficas no resultado final.
3. Sistema ELISA com deteção final em quimioluminescência - ARCHITECT C 4000 Immunoassay Analyzers da Abbott Diagnostics.
 - *Syphilis TP* é um imunoensaio com recurso a micropartículas com deteção final em quimioluminescência de anticorpos anti-TpN15, TpN17 and TpN47 de *Treponema pallidum*. Numa primeira fase, a amostra é adicionada a

micropartículas revestidas pelas proteínas recombinantes (antígenos) e a amostra é diluída posteriormente. Os anticorpos presentes na amostra ligam-se aos antígenos alvo, havendo uma etapa de lavagem e, posteriormente, é adicionado uma solução conjugado (anticorpos anti-IgG e IgM humanas marcados com acridínio). Após nova etapa de lavagem é feita a leitura em quimioluminescência, em unidades relativas de luz (RLUs). O resultado é considerado positivo/reactivo ou negativo/não reativo se o sinal de quimioluminescência obtido superior ou inferior ao valor de cutoff estabelecido pela calibração.

HEMATOLOGIA CLINICA

Introdução

O Setor de Hematologia do serviço de patologia clínica do Hospital São João, do Porto, encontra-se situado no 4º andar, e é dirigido pelo Médico Patologista Luís Marinho. Dispõe de uma área destinada aos equipamentos, duas salas de microscopia e validação médica e dois armazéns de material e reagentes.

Em média diária, o número de amostras clínicas realizadas ronda as 1300, com picos máximo à segunda-feira e mínimo ao fim-de-semana; quantidade que inclui as amostras de neonatologia e pediatria, uma vez que estão inseridos no mesmo hospital.

O contexto hospitalar é completamente distinto da realidade de ambulatório, já que as amostras sendo provenientes de doentes com patologias associadas são predominantemente positivas em termos de alterações hematológicas.

Os valores de referência para a normalidade são calculados a partir de grupos de indivíduos saudáveis, no entanto em situação de patologia os critérios são estabelecidos de modo diferente, ajustados à amostra em causa. Neste sentido, a intervenção clínica dos médicos e técnicos permite suportar a tese de diagnóstico, se numa fase precoce, de monitorização da efetividade e segurança se num contexto terapêutico (em oncologia) e de alerta para valores críticos se num pós-operatório.

Colheita, Conservação e Transporte das amostras sanguíneas

As amostras analisadas no Serviço de Hematologia Clínica são sangue total em EDTA dissódico e ou em citrato trissódico (confirmação de trombocitopenias) e são obtidas por venopunção pelo sistema de vácuo. O sal disódico de EDTA é um anticoagulante eficaz e muito usado em hematologia, com maior solubilidade que o sal trissódico, encontrando-se na forma vaporizada nas paredes do tubo de modo a garantir uma maior captação pela amostra sanguínea. Encontra-se na concentração 1,2 mg do sal anidro por mL sangue, atuando por quelação dos iões cálcio presentes no sangue. No entanto, o excesso deste anticoagulante causa alterações eritrocitárias e leucocitárias (degeneração e lise das células), com redução do hematócrito após centrifugação e aumento da concentração de hemoglobina corpuscular média, conduzindo ainda a uma falsa trombocitose por provocar desintegração plaquetária. No caso do anticoagulante citrate trissódico, o fator de diluição é maior, 9 volumes de sangue para 1 de anticoagulante, sendo crítico em termos de

osmolaridade e alterações da concentração do cálcio livre (principalmente nos testes de estudo da coagulação sanguínea não realizados no serviço de Hematologia Clínica do CHSJ).

(12)

Os tubos de amostras, devidamente identificados, chegam ao laboratório via sistema de vácuo ou através de profissionais (Assistentes Operacionais), sendo separados e triados conforme o local da colheita (serviço), grau de urgência e o tipo de análise.

Processamento das amostras

A fase pré-analítica corresponde à receção das amostras no laboratório, devidamente etiquetadas com um código de barras (com informação relativa ao paciente e pedido de análise), que permite o registo dessa receção, verificar a qualidade da amostra e detetar eventuais erros de modo precoce

De modo a maximizar o rendimento e a diminuir o erro, as amostras entram num sistema em cadeia de autoanalisadores hematológicos. Depois, através do organizador e arquivador *TS-500*, as amostras são distribuídas pelos equipamentos com base na informação transmitida pelos códigos de barras (por intermédio do sistema informático *Sysmex*, *middleware*, que estabelece a ligação entre o sistema informático *CLINIDATA* e os equipamentos, processando automaticamente a informação).

Após a execução das análises, procede-se à validação técnica dos resultados (confirmação dos dados do doente: idade, sexo, patologias, histórico e valores identificativos do doente (como o volume médio globular), condições da amostra: hemodiluída, hemoconcentrada, hemolisada, lipémica, ictérica tubo de colheita errado, volume de amostra, coagulada, entre outros), e à inserção dos dados no sistema informático *Sysmex*. Posteriormente, na fase pós-analítica o patologista clínico valida os resultados.

Controlo de Qualidade

I. Controlo de qualidade interno - Pode ser facultado pelo fornecedor dos equipamentos ou realizado com amostras de doentes (tabela 22).

Equipamentos	Níveis de controlo de qualidade
<i>XT-2100D</i> e <i>XT-5000</i>	alto, médio e baixo (<i>Sysmex</i>) – modo automático 1 nível (alternadamente)– modo aberto
BIO-RAD VARIANT II Hemoglobin Testing System	3 níveis preparados com <i>Dilution Solution</i>
<i>VES-MATIC 60</i> e <i>VES-MATIC cube 200</i>	2 níveis: alto e normal

Tabela 22

2. Controlo de qualidade externo - É usado o programa UK NEQAS: contagem manual e automática nos equipamentos XE-5000 e XE-2100D, avaliação de dois esfregaços de sangue periférico, contagem de reticulócitos e uma situação para indicar as cinco principais alterações presentes a reportar ao clínico.

3. Calibração – a calibração dos equipamentos é realizada pelos técnicos das respetivas casas comerciais.

Estudo Laboratorial das Células Sanguíneas

Sistema hematopoiético

As células sanguíneas presentes no sangue periférico são produzidas na medula óssea, estando apresentado na tabela 23 os locais de hematopoiese ao longo da idade.

Locais de hematopoiese ao longo da vida	
Feto	0-2 meses saco vitelino 2-7 meses fígado e baço 5-9 meses medula óssea
Criança	Medula óssea em quase todos os ossos
Adulto	Medula óssea (vértebras, costelas, esterno, sacro, pélvis e extremidade proximal do fémur)

Tabela 23

As células hematopoiéticas (HPC) são responsáveis pela produção de células sanguíneas funcionais e não são frequentemente detetadas nas extensões de sangue periférico, com exceção dos recém-nascidos e das mulheres gestantes. Contudo, surgem mais em doentes com leucemia ou noutras doenças do foro hematológico e em situações de infeção severa.

(13)

- Desenvolvimento das células sanguíneas

Eritropoiese

Diariamente são produzidos 10^{12} eritrócitos, sendo apresentadas as células precursoras eritróides na ilustração 7.

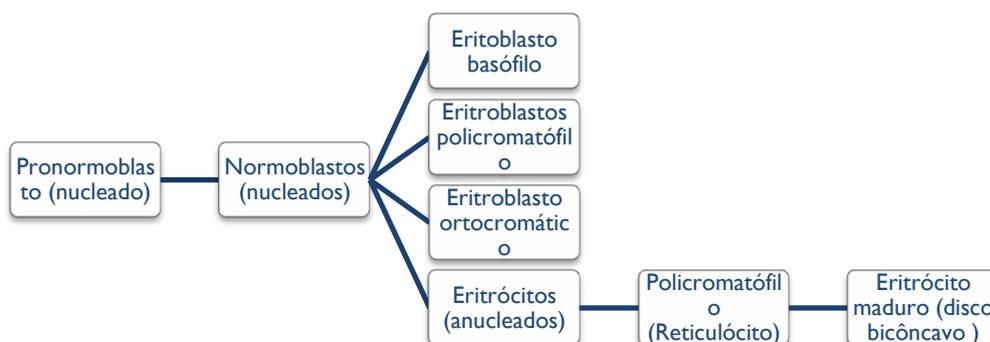


Ilustração 7

São apresentadas na tabela 24 as características das respectivas células supra mencionadas: composição em ácidos nucleicos e localização - medula óssea ou sangue periférico. ⁽¹⁴⁾

Características e localização	Normoblastos	Eritrócito policromatófilo	Eritrócito maduro
ADN nuclear	Sim	Não	Não
ARN citoplasmático	Sim	Sim	Não
Medula óssea	Sim	Sim	Sim
Sangue periférico	Não	Sim	Sim

Tabela 24

No sangue periférico de indivíduos saudáveis as células eritróides nucleadas encontram-se presentes em número residual (com exceção dos recém-nascidos e mulheres gestantes), sendo facilmente reconhecidas pela coloração rosa acinzentada do citoplasma e pela morfologia semelhante à linfocitária (contudo apresentam menor rácio núcleo/citoplasma e densidade de coloração nuclear homogénea).

Os eritrócitos maduros são anucleados, apresentam contorno redondo e regular, tamanho próximo ao do núcleo dos linfócitos e coloração citoplasmática acidófila (rosa) devido ao elevado conteúdo em hemoglobina. Apesar de predominar a forma de disco bicôncavo, podem ser encontrados outras, nomeadamente ovalócitos, picnócitos e esquizócitos em amostras de neonatologia. ⁽¹⁴⁾

Megacariopoiese

O megacariócito é uma célula de grandes dimensões que por fragmentação do citoplasma origina as plaquetas (na medula óssea), apresenta um citoplasma basófilo, com muitos grânulos citoplasmáticos e, geralmente, surge com muitas plaquetas adjacentes na periferia. ⁽¹⁴⁾

As plaquetas são pequenos fragmentos granulares azul acinzentados com muitos grânulos vermelho arroxeados de pequenas dimensões - inferior ao tamanho dos eritócitos ou próximo quando se trata de plaquetas grandes ou gigantes. Em termos de análise da extensão do sangue periférico, importa avaliar a presença de anisocitose plaquetária nas situações de trombocitopenia (abordada posteriormente), sendo obrigatório registar em comentário a presença de megacariócitos caso sejam observados. ⁽¹⁵⁾

Granulopoiese

A série granulocítica é apresentada na ilustração 8 e as principais características que permitem diferenciar as células desta série (até ao metamielócito), constam da tabela 25.

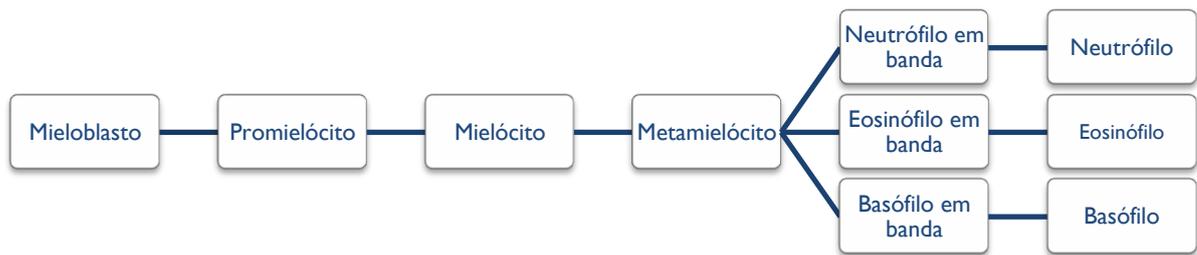


Ilustração 8

Características	Mieloblasto	Promielócito	Mielócito	Metamielócito
Presença no sangue periférico	Muito rara	Muito rara	Incomum	Reduzida
Tamanho e forma	Monócito > Mieloblasto > Linfócito	Superior ao do Mieloblasto	Inferior ao do Promielócito	Inferior ao do Mielócito
Rácio núcleo/citoplasma	Elevado	Inferior ao do Mieloblasto	Progressivamente menor	
Citoplasma	Escasso e basófilo (azul)	Mais abundante e basófilo que o do Mieloblasto	Azul-rosa	Rosa
Forma nuclear	Redonda	Redondo a oval e excêntrico Zona perinuclear clara	Redondo a oval	Em U ou C
Condensação da cromatina	Difusa	Maior grau de condensação que no mieloblasto	Maior grau de condensação da cromatina que no Promielócito	Grau idêntico ao do mielócito
Nucléolo	Pode ser visível	Visível	Ausente	
Granulações	Ausência	Primárias (azurófilas)	Primárias e secundárias (específicas das linhas celulares)	Apenas secundárias (específicas das linhas celulares)

Tabela 25

As formas em banda, ou bastonetes, são referidos posteriormente por já permitem a diferenciação dos granulócitos.

Neutrófilo em banda. Os neutrófilos em banda são uma população minoritária no sangue periférico de indivíduos saudáveis. Apresentam características intermédias entre metamielócitos de neutrófilos e neutrófilos segmentados e são contabilizados nos neutrófilos segmentados. O núcleo é irregular, com forma em banda ou fita, diferindo do neutrófilo segmentado/maduro por não apresentar o núcleo segmentado. As formas em banda quer do eosinófilo, quer do basófilo são bastante incomuns, pelo que não são descritas.⁽¹⁵⁾

Neutrófilo segmentado. É o tipo de leucócitos mais abundante e frequente em indivíduos adultos saudáveis e recém-nascidos durante os primeiros dias de vida (depois os linfócitos passam a predominar até aos 4-5 anos, regressando ao predomínio inicial que se estende e mantém durante a fase adulta).

Devido à sua grande mobilidade e capacidade fagocitária intervêm na resposta inflamatória aguda. O núcleo é segmentado (3-5 lóbulos), predominando os com 3-4 segmentos, estando os segmentos conectados por fragmentos de cromatina. A cromatina apresenta aglomerações e está normalmente na periferia do núcleo, onde se condensa (corando de violeta).⁽¹⁶⁾

Podem aparecer formas hipossegmentadas (*Pelger-Huët* congénitos) ou neutrófilos com apenas um núcleo redondo, que apesar de não levantar problemas em termos de clínica por serem alterações congénitas, não devem ser confundidos com desvio à esquerda (abordado posteriormente). Contudo, se em contexto de neutropenia, esta hipossegmentação (*Pseudo Pelger-Huët* ou *Pelger-Huët* adquiridos) está associada a neoplasias. Ainda podem ser observados neutrófilos hipersegmentado (designa desvio à direita), que apresentam mais de 5 lóbulos devido à deficiência em cianocobalamina (vitamina B₁₂) ou ácido fólico (vitamina B₉), associados a macrocitose.⁽²⁰⁾

O citoplasma é abundante e cora de rosa, apresentando muitas granulações secundárias de pequenas dimensões, específicas dos neutrófilos.⁽¹⁵⁾

O aumento do número de granulações é frequente em situações de infeção ou respostas inflamatórias – granulações tóxicas, podendo também ocorrer durante a gravidez. Quanto às inclusões citoplasmáticas (hereditárias ou adquiridas), as mais comuns são os corpos de *Döhle* durante a gravidez e na resposta a situações de infeção ou inflamação. Outro tipo de alterações citoplasmáticas comuns são os vacúolos citoplasmáticos que surgem em resposta a infeções severas, estando associados à presença de granulações tóxicas, no entanto podem ser mero artefacto.⁽¹⁴⁾

Eosinófilo. Representam menos de 5 % dos leucócitos circulantes no sangue periférico do indivíduo adulto saudável, sendo um pouco maiores que os neutrófilos. A maioria apresenta núcleo bilobulado (cromatina violeta grosseiramente aglomerada), com citoplasma abundante com grânulos secundários eosinófilos (laranjas) de maiores dimensões e mais uniformes que os dos neutrófilos.⁽¹⁵⁾

Basófilo. É a população menos frequente dos leucócitos circulantes, até 1,5% em indivíduos adultos saudáveis. Apresentam tamanho intermédio entre os neutrófilos e os eosinófilos, com um núcleo bilobulado em que os segmentos nucleares tendem a

dobrar-se (um sobre o outro) resultando num núcleo denso, irregular e compacto. Devido à presença de numerosas e grandes granulações secundárias basófilas (que coram de azul escuro ou púrpura) o núcleo costuma não ser observável.

Estes são precursores dos mastócitos, classificados como os basófilos dos tecidos periféricos. ⁽²²⁾

Monócitos. São os leucócitos circulantes de maior dimensão e a terceira população leucocitária mais frequente, no sangue periférico de um indivíduo adulto saudável. São células com grande mobilidade e capacidade fagocitária, sendo precursores dos macrófagos que se encontram nos tecidos periféricos e nos órgãos linfóides.

Têm um núcleo grande, frequentemente com forma de ferradura, podendo estar dobrado em espiral (mas nunca segmentado). A cromatina é mais laxa (fina) e está distribuída mais uniformemente que nos núcleos dos neutrófilos e podem ser observados dois ou mais nucléolos. O citoplasma é amplo e cora de azul-acinzentado pálido, contendo numerosas e finas granulações lisossômicas de pequenas dimensões (rosa-violácias) e vacúolos citoplasmáticos. Por vezes são difíceis de distinguir dos linfócitos T ativados presentes em amostras de doentes com Mononucleose Infeciosa, ou das células circulantes nos Linfomas de alto grau. Contudo, as duas características principais que permitem auxiliar na identificação são: a cor do citoplasma (sendo cinza e azul nos monócitos e linfócitos respetivamente) e o grau de condensação da cromatina (mais compacta nos linfócitos).⁽¹⁵⁾

Linfopoiese

A partir de uma célula imatura, linfoblasto são gerados os diferentes linfócitos (Linfócitos B, T e células *Natural Killer*). Este blasto apresenta elevado rácio núcleo/citoplasma, com núcleo moderadamente denso e cromatina laxa.

Cerca de 85% dos linfócitos circulantes são Linfócitos T ou células *Natural Killer*, circulando na forma inativa, com dimensões pequenas e redondas, com uma delgada (variável conforme a atividade dos linfócitos) lâmina de citoplasma que contém, em ocasiões, alguns grânulos azurófilos. O núcleo tem um tamanho uniforme, geralmente redondo e cora marcadamente de violeta, apresentando uma cromatina homogénea com algumas aglomerações na periferia nuclear.

Os linfócito são a população maioritária, a seguir aos neutrófilos, no sangue periférico de indivíduos adultos saudáveis, no entanto nos idosos o número de linfócitos diminui, (refletindo-se na contagem leucocitária).⁽¹⁶⁾

As infecções virais são responsáveis pela maioria das alterações linfocíticas. Quando ativados, os linfócitos apresentam dimensões maiores (com relação núcleo citoplasma menor), cromatina menos compacta, podendo o citoplasma conter granulações azurófilas – Linfócitos grandes granulares, ou linfócitos grandes (na ausência de granulações). Os linfócitos grandes granulares podem representar até 10-20% dos linfócitos do sangue periférico dos indivíduos saudáveis sendo contabilizados na contagem dos linfócitos (acrescentando comentário caso a percentagem aumente). Nas crianças é frequente encontrarem-se linfócitos grandes e mais pleiomórficos que nos adultos. ⁽¹⁵⁾

Tanto nas infecções víricas e bacterianas graves, como no Mieloma Múltiplo, aparecem células plasmáticas. Estes plasmócitos resultam da diferenciação dos linfócitos B em resposta ao estímulo imunitário, apresentando-se redondos a ovais, com núcleo pequeno e redondo, com posição excêntrica que cora marcadamente roxo. A cromatina está grosseiramente aglutinada, com nucléolo não visível, citoplasma azul com uma zona paranuclear clara, podendo apresentar-se formas binucleadas. ⁽²⁰⁾

Menos frequente, a linfocitose surge associada a alterações morfológicas, no caso de patologias neoplásicas (Leucemias Linfóides como nos Linfomas).

Técnicas laboratoriais em Hematologia Celular

- Hemograma e citologia

O hemograma consiste numa análise quantitativa e qualitativa dos elementos celulares do sangue (eritrócitos, leucócitos e plaquetas), sendo um dos exames complementares de diagnóstico mais requisitado.

No CHSJ como o volume de trabalho é elevado, as amostras são analisadas por autoanalisadores hematológicos e sempre que os critérios de validação automática forem violados, as amostras são colocadas num equipamento que prepara e cora esfregaços de sangue periférico. Os Autoanalisadores hematológicos usados são Sysmex XE – 2100 D e Sysmex XE – 5000, que se dividem em sete canais, cada um dos quais permite uma determinação específica (tabela 26)

Parâmetros	Métodos
Hemoglobina	Espectrofotometria (SLS)
RBC/PLT (eritrócitos e plaquetas)	Impedância elétrica (Princípio de Coulter)
DIFF (diferencial de leucócitos)	Citometria de fluxo e fluorescência
WBC/BASO (contagem de basófilos)	

IMI (células imaturas granulocíticas)	
NRBC (eritrócitos nucleados)	
RET (reticulócitos/eritócito policromatófilo).	

Tabela 26

Canal para a determinação da concentração de hemoglobina: A Hemoglobina é uma proteína formada por quatro grupos hemo e quatro cadeias de globina, responsável pelo transporte de O₂ pelos eritrócitos. Nos eritrócitos normais do adulto, a Hb A (α₂-β₂) constitui 97%; a Hb A₂ (α₂-δ₂) representa quase 3% e menor que 1% é Hb F (fetal) (α₂-γ₂). Em termos clínicos, a diminuição da concentração de Hb, decorrente da diminuição da massa eritrocitária, define a anemia (tabela 27).⁽²⁰⁾

Anemia	Causas
Microcítica	Anemia por Deficiência de ferro Anemia da Doença Crônica Anemia Sideroblástica congênita Talassemia
Normocítica	Início de Anemia por Deficiência de ferro Início de Anemia da Doença Crônica Perda de sangue recente Deficiência combinada de ferro e ácido fólico ou Vitamina B12 Falência renal Anemia Hemolítica
Macroscítica	Deficiência de Vitamina B12 Deficiência de Ácido Fólico Administração de fármacos Patologia hepática Excesso de álcool Hipotireoidismo Anemia Hemolítica Síndrome Mielodisplásico

Tabela 27

Canal RBC/PLT: A maioria dos contadores de células sanguíneas determinam o número de eritrócitos (RBC), o volume eritrocitário médio (VCM) e a concentração de hemoglobina ([Hb]). Os restantes parâmetros eritrocitários, incluindo o hematócrito (Ht), hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) são calculados a partir dos primeiros.

Determinação do hematócrito (Ht): Define-se como a relação entre a coluna de RBC (*Red blood cells* ou eritrócitos) e a coluna de sangue total, sendo apresentado em percentagem.

$$\text{Ht (\%)} = \text{RBC} \times \text{VCM}$$

Causas de erro e determinação do microhematócrito: Quando a CHMC está elevada (> 37 g/dL), o número de eritrócitos é baixo e o RDW está aumentado, suspeita-se

da presença de crioglobulinas que são auto-anticorpos anti-eritrocitários capazes de aglutinar os eritrócitos a frio. De modo a ser contornada esta situação, as amostras são aquecidas a 37° C durante 30 ou 60 minutos conforme o valor seja superior a 37 ou 37,5 g/dL, respetivamente; depois repete-se o hemograma no *Sysmex XE-5000* (no canal dos reticulócitos/plaquetas óticas, onde a temperatura atinge os 41 °C havendo a correção dos valores hematimétricos caso a causa seja a presença de crioglobulinas).

Se depois do aquecimento a MCHC se mantiver elevada e, paralelamente, existir microcitose, com o número de eritrócitos e concentração de hemoglobina normais, a alteração do hematócrito deve-se a perturbações na leitura de absorvância por turvação da amostra (lipémia, hemólise ou amostra ictérica) sendo determinado o microhematócrito.

O microhematócrito é determinado após a microcentrifugação de uma alíquota de amostra (a 12000 rpm durante 5 minutos) num tubo capilar e a leitura do volume de eritrócitos na coluna de sangue, com recurso a uma escala de referência *MiKro-Hämatokrit da Heraeus Instrument* em mm.⁽¹⁷⁾ Na tabela 28 encontram-se resumidas as situações que podem causar alterações deste parâmetro.

Resultados do Microhematócrito em mm	Interpretação
Diminuído	Hemodiluição da amostra ou perda maciça de sangue.
Aumentado	Hemoconcentração da amostra por desidratação ou policitémia vera.

Tabela 28

Determinação dos índices eritrocitários:

- **Volume corpuscular médio (VCM):** Este parâmetro avalia a média do tamanho (fL) dos eritrócitos, sendo esta a média das amplitudes de voltagem produzidas aquando da passagem das células (tabela 29).

Volume corpuscular médio	Interpretação
Microcitose	Défice de ferro e talassemias
Macrocitose	Reticulocitose, alcoolismo e défice de vitamina B ₁₂ ou ácido fólico

Tabela 29

- **Hemoglobina corpuscular média (HCM):** É a concentração média de hemoglobina em cada eritrócito (pg), determinada através do seguinte cálculo:

$$HCM = [Hb] / RBC$$

- Concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC): É a concentração média de Hb por unidade de volume de eritrócitos (g/dL). Este índice (MCHC) permite a avaliação do grau de saturação de Hb no eritrócito (tabela 30).

MCHC	Interpretação
Diminuída	Eritrócitos hiperocrômicas
Aumentada	Eritrócitos hipocrômicos

Tabela 30

$$\text{MCHC} = [\text{Hb}]/\text{Ht}$$

- Índice de variação do tamanho dos eritrócitos (RDW - Red Cell Distributions Width). Este índice quantifica a anisocitose eritrocitária, sendo a variação do tamanho dos eritrócitos analisada eletronicamente pela variação de pulsos, que gera dois índices: RDW-SD (desvio standard do índice RDW) apresentado em fL e RDW-CV (coeficiente de variação do índice RDW) em percentagem. Em caso de dupla população eritrocitária o RDW está aumentado.

Canal NRBC (Eritroblasto). Os eritroblastos são apresentados em número absoluto e em relativo (%), estando na tabela 31 explicadas as situações clínicas que conduzem ao aumento destes.

Aumento do n.º. de eritroblastos	
Fisiológico	Recém-nascidos
Patológico	Anemias regenerativas Stress hematopoiético Síndromes Mieloproliferativas

Tabela 31

Canal Reticulócitos. Os reticulócitos são células anucleadas que ainda apresentam ARN ribossomal, marcado por um corante fluorescente. Depois, por citometria de fluxo e fluorescência, é realizada a contagem destas células e avaliado o grau de maturação (tabela 32), atendendo a que:

- Os reticulócitos mais imaturos têm mais ARN, pelo que emitem uma fluorescência mais forte (índice *HFR: High Radiofrequency*); normalmente emitem uma fluorescência mais baixa (*LFR: Low Radiofrequency*);
- Os reticulócitos em estadio intermédio emitem uma fluorescência intermédia (*MFR: Medium Radiofrequency*).

Nº. Reticulócitos	Interpretação
Reticulopenia	IRF aumentada: medula óssea está a repor os eritrócitos
	IRF diminuído: anemia aplásica grave ou insuficiência renal
Reticulocitose	IRF aumentada: hemólise aguda ou perda de sangue
Contagem normal a baixa	IRF aumentada: Deseritropoiese e resposta precoce ao tratamento de anemia aplásica grave

Tabela 32

Determinação dos índices plaquetários:

No que respeita às alterações plaquetárias apenas existem em termos quantitativos (trombocitopenia e trombocitose).

Na trombocitopenia sem histórico clínico e com anisocitose plaquetária (devido à presença de agregados plaquetários, ou esquizócitos, ver ilustração 9), o número de plaquetas é confirmado por fluorescência.

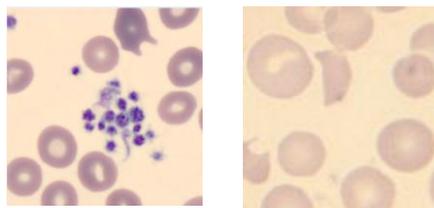


Ilustração 9

Nas restantes situações de trombocitopenia (sem grandes alterações no histograma) é fundamental a verificação de coágulo na amostra e a realização de um esfregaço de sangue periférico. A trombocitopenia pode adivir da presença de plaquetas gigantes, que são contadas como eritrócitos pelo método de impedância (eritrocitose com trombocitopenia e satelitismo plaquetário – ver ilustração 10).⁽²⁰⁾

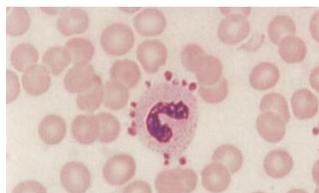


Ilustração 10

Após contagem por fluorescência, se o número de plaquetas for superior ao obtido por impedância a causa é a presença de agregados plaquetários, caso diminua deve-se à presença de esquizócitos.

Apesar da metodologia dos autoanalisadores ser mais exata, precisa e rápida que a manual, quando o número de plaquetas é igual ou inferior $10 \times 10^3/\mu\text{L}$ a maioria dos autoanalisadores faz contagens sobreestimadas em cerca de 10 a 30% relativamente ao método standarizado internacional com uso de anticorpos monoclonais.

As causas de falsa trombocitopenia incluem: amostra coagulada (pequenos coágulos ou fibrina) agregação plaquetar ou satelitismo e quelação por catiões divalentes em amostras anticoaguladas (anticoagulante EDTA).⁽¹⁶⁾ Nesta última situação, a contagem plaquetar é realizada em duas amostras de sangue, uma anticoagulada com EDTA e outra com citrato, ou por estimativa do número por contagem manual. O número de plaquetas pode ser determinado por estimativa através da observação de esfregaços de sangue periférico (com exceção dos doentes com anemia), na ausência de agregados plaquetários. Numa contagem normal, aproximadamente 8 a 15 plaquetas (isoladas ou em pequenos agregados), devem ser observadas por campo numa ampliação de $\times 1000$, devendo existir 1 plaqueta por cada 20 eritrócitos.⁽¹⁷⁾

Quanto às causas de pseudotrombocitose, estão incluídas a microcitose severa (micrócitos contabilizados como plaquetas), crioglobulinas e fragmentos de leucócitos.

- Determinação do MPV (volume plaquetário médio, em fL). O volume plaquetário médio indica a média do volume de plaquetas e constitui um parâmetro muito útil sobretudo em trombocitopenias, na determinação da sua origem intravascular/periférica ou central/medular (aumentado ou diminuído, respetivamente).
- Determinação do PDW (Platelet Distribution Width, em fL). Este parâmetro permite avaliar a presença de anisocitose plaquetária, particularmente útil na deteção de plaquetas jovens enquanto marcador de megacariopoiese medular. O PDW permite, ainda, diferenciar trombocitemia essencial da trombocitose reativa, visto que se encontra aumentado e diminuído, respetivamente.⁽¹⁷⁾
- Determinação do P-LCR (Platelet large cell ratio em %). O P-LCR é o quociente do número de plaquetas com tamanho inferior a 12 pelo número total de plaquetas, que se estiver aumentado pode indicar a presença de destruição imune periférica de plaquetas.⁽¹⁷⁾
- Determinação do plaquetócrito (PCT em %). Define-se como a percentagem do volume de plaquetas sobre o volume total de sangue, não apresentando grande significado em termos clínicos, sendo calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{Plaquetócrito} = \text{MPV} \times \text{PLT}$$

Avaliação qualitativa, quantitativa e diferencial leucocitária

A contagem dos leucócitos (em valor absoluto e relativo) e fórmula leucocitária processa-se no Canal DIFF, por citometria de fluxo utilizando um laser semi-condutor para a determinação dos ângulos frontal e lateral e marcação por fluorescência para o diferencial (metodologia descrita na Ilustração 11).

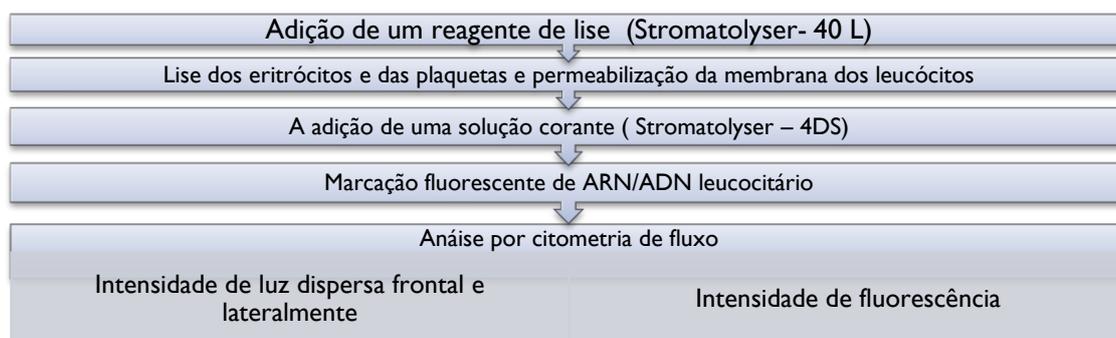


Ilustração 11

No sangue periférico, os leucócitos observados na ausência de doença são: neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos. Em situações patológicas, encontram-se linfócitos atípicos, granulócitos imaturos e blastos (valores de referência no anexo 19).

Canal WBC/BASO. A adição de um reagente de lise ácido destrói as membranas dos eritrócitos, plaquetas e dos leucócitos com exceção dos basófilos, permitindo a contagem de basófilos por citometria de fluxo.

Canal IMI. Através da adição de um reagente de lise membranar que leva à destruição das células com maior teor lipídico (maduras), os granulócitos imaturos são detetados por citometria de fluxo.

Outros Estudos Laboratoriais

- Velocidade de Sedimentação

A velocidade de sedimentação eritrocitária é útil mas inespecífica de processos inflamatórios. É um indicador que, juntamente com a história clínica do doente e dados de exame físico, se revela útil no rastreio de reações inflamatórias agudas e na monitorização de doenças crónicas inflamatórias (auto-imunes e do foro oncológico). No entanto, nos processos agudos apresenta menor sensibilidade e é muito influenciada pelas proteínas plasmáticas, temperatura ambiente, presença de anemia, bem como por alterações fisiológicas (gravidez e ciclo menstrual, tabagismo e medicamentos). ⁽¹⁸⁾

Fundamento. A membrana dos eritrócitos contém proteínas e glicoproteínas numa bicamada lipídica que confere flexibilidade à célula. As glicoproteínas encontram-se associadas a moléculas de ácido siálico conferindo cargas negativas aos eritrócitos, criando forças repulsivas entre eles. Durante os processos inflamatórios há aumento da produção hepática de proteínas de fase aguda, responsáveis pela neutralização da carga dos eritrócitos e, conseqüente, anulação das forças repulsivas, levando à aglutinação eritrocitária em coluna (feito *rouleaux*) e sedimentação mais rápida. ^{(19),(20)}

Equipamentos:

Os equipamentos disponíveis são equivalentes em termos de metodologia e sistema de de detecção, no entanto o *VES-MATIC CUBE 60* permite a determinação da VS em amostras com volume reduzido, assim como a confirmação de resultados obtidos no *VES MATIC CUBE 200*, quer sejam elevados (> 140 mm), baixos (1mm) ou indeterminados (tabela 33)

<i>VES MATIC CUBE 200</i>	Método de Westergreen modificado Amostra: tubos com o anticoagulante EDTA Leitura de VS: óptica electrónica
<i>VES-MATIC CUBE 60</i>	Método de Westergreen modificado Amostra: transferida para tubo VACU-TEC (citrato de sódio) Leitura de VS: óptica electrónica - aos 0 e 20 minutos Vantagem: Permite Confirmação de resultados de VS - elevados (> 140 mm), baixos (1mm) ou indeterminados

Tabela 33

- Hemoglobina Glicada

Segundo a Norma da Direção Geral de Saúde 033/2011, de 30/9/2011 - Prescrição e Determinação da Hemoglobina Glicada A_{1c}, a hemoglobina glicada resulta de uma reação não enzimática, lenta e irreversível (glicação), entre a glicose que circula no sangue e os grupos amina livres existentes na hemoglobina dos eritrócitos. Previamente à glicação, ocorre uma reação enzimática reversível (glicosilação), por meio de glicosiltransferases, formando-se uma Hb A_{1c} lábil ou préHbA_{1c}, que pode interferir com alguns ensaios, embora isso não aconteça, presentemente, na maioria dos métodos laboratoriais. A glicação da hemoglobina depende da concentração da glicose a que os eritrócitos são expostos, durante o tempo de vida destas células. Deste modo, a hemoglobina glicada é um indicador de grande utilidade clínica, refletindo a glicemia média nas últimas 8 a 12 semanas (*turnover* eritrocitário é de 120 dias). Permite avaliar o grau de controlo glicémico e estabelecer o diagnóstico de *Diabetes Mellitus*. Contudo devem

ser consideradas as causas de interferência neste parâmetro, e destacar as alteração do turnover eritrocitário e hemoglobinopatias.

Relativamente aos resultados, estes devem ser apresentados nas unidades indicadas pela International Federation of Clinical Chemistry (mmol/mol), bem como em percentagem (National Glycohemoglobin Standardization Program/ Diabetes Control and Complication Trial). Também é recomendada a apresentação do valor da glicemia média estimada, obtida por cálculo a partir do valor da HbA_{1c} em percentagem (Anexo 15).⁽¹⁾

Equipamento: *BIO-RAD VARIANT II Hemoglobin Testing System* - determina a percentagem de hemoglobina A_{1c} no sangue total humano utilizando o método de análise de HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Após separação das hemoglobinas por HPLC, estas passam pela célula de fluxo do fotómetro e é determinada a absorvância aos 415 nm. Esta metodologia permite detetar hemoglobina A_{1c} sem interferência das variantes da hemoglobina A_{1c} lábil, hemoglobina carbamylada, lipémia, para além de quantificar HbA_{1c} na presença de hemoglobina S, C e F.

Validação biopatológica dos resultados

De um modo geral, sempre que houver alterações quantitativas, os resultados devem ser acompanhados por comentário baseado na análise do esfregaço de sangue periférico. Contrariamente aos analitos doseados em Química Clínica, as alterações fisiológicas afetam muito mais em termos quantitativos as células sanguíneas (nº. total de leucócitos e diferencial leucocitário) devido ao processo de resposta adaptativa medular aos sinais hormonais e às citocinas.

Todos os resultados são obrigatoriamente interpretados por Patologistas Clínicos, essencialmente com base em intervalos de referência adotados pelo laboratório e no histórico do doente (anexo 19)

Análise de histogramas e scattergramas:

Na tabela 34 encontram-se os dados obtidos a partir dos gráficos scattergrama e histograma apresentados no anexo 18.

Células	Interpretação
Blastos	Células imaturas indiferenciadas.
Granulócitos imaturos (IMI)	Apenas incluem células imaturas da linha mieloide (promielócito, mielócito e metamielócito) com exceção dos bastonetes. A presença de granulócitos imaturos no sangue periférico é um indicador para o diagnóstico precoce de sépsis, e o número de granulócitos imaturos permite estabelecer um prognóstico favorável e monitorizar estes doentes ⁽²¹⁾
Desvio à esquerda	Aumento da fração das formas em banda e neutrófilos hipossegmentados, podendo aparecer metamielócitos, promielócitos e mielócitos. ⁽²⁰⁾ Embora as formas em banda, metamielócitos e ocasionalmente mielócitos com granulações tóxicas sejam mais comuns na sépsis por infeção aguda bacteriana, em infeções severas as formas imaturas promielócitos e mielócitos também são observadas (Reação leucemóide que permite diferenciar de leucemias). O número de formas em banda também pode aumentar, comumente durante a gravidez. ⁽¹⁷⁾
Linfócitos atípicos	(referidos anteriormente)
Linfócitos anormais/linfoblastos	
Células progenitoras hematopoiéticas (HPC)	
Eritrócitos nucleados ou eritroblastos (NRBC)	É muito importante esta diferenciação, uma vez que nos contadores de células sanguíneas em que não ocorre esta distinção, estas células entram na contagem de leucócitos levando a falsa leucocitose, que tem que ser esclarecida através de uma contagem manual – quantos NRBC existem em 100 leucócitos, havendo a correção do número de leucócitos: (n°. total de células nucleadas - n°. NRBC)
Plaquetas reticuladas (IPF)	(referidas anteriormente)
Hemoglobina dos reticulócitos	O doseamento permite suportar o diagnóstico e tipo de anemia, bem como o seguimento durante a terapêutica.
Agregados plaquetários	(referidos anteriormente)

Tabela 34

Estudo de Extensão de sangue periférico normal:

Os elementos do sangue pertencem a três classes funcionais fundamentais: eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Sempre que surgirem comentários morfológicos nos resultados do hemograma é necessário realizar uma extensão do sangue periférico, assim como nas anemias sem histórico (por permitir avaliar a necessidade de pedido de mielograma), trombocitopenias (sem presença de coágulo e sem histórico), quando não for realizado diferencial leucocitário ou existirem alterações na forma do respetivo scattergrama e nas alterações qualitativas leucocitárias. ⁽¹⁵⁾

O método habitual para o estudo do sangue consiste em realizar uma extensão de sangue periférico sobre uma lâmina de vidro, podendo ser manual ou automaticamente. No CHSJ as extensões de sangue periférico são realizadas e marcadas por uma coloração policromática (com os corantes *May-Grünwald* e *Giemsa*) automaticamente no equipamento *SP-1000i* a não ser que as amostras estejam em tubos pediátricos. O *SP-1000i* adequa a espessura da gota de sangue a

pipetar com base no valor do hematócrito, uma vez que a espessura e a inclinação da lâmina que executa a extensão determinam a qualidade do esfregaço. Depois as lâminas são colocadas no equipamento *Cell-Vision DM 96* que procede à análise digital das células sanguíneas (através do microscópio ótico incorporado), sendo as imagens transferidas para o respetivo sistema informático e, em caso de dúvidas na interpretação das imagens, os esfregaços são observados manualmente.

A contagem automática apresenta a vantagem de maior precisão (na ausência de populações celulares anormais) por contar mais leucócitos (200 leucócitos, enquanto que no método manual apenas 100), exatidão e reprodutibilidade em leucocitoses e leucopenias. ⁽¹⁵⁾ Apresenta, ainda, dispõe de uma base de dados que permite a classificação das células, podendo ser sempre reclassificadas pelo Patologista Clínico.

Técnica de May-Grünwald-Giemsa. Dependendo da afinidade dos distintos organelos celulares para os corantes usados, é possível identificar quatro características específicas: basofilia, azurofilia, eosofilia e neutrofilia, sendo detalhadas na tabela 35. ⁽¹⁴⁾

Característica	Cor	Fundamento
Basofilia	Azul escuro	Afinidade pelo corante básico azul de metileno, sendo característica do ADN nuclear, ARN citoplasmático (por exemplo dos ribossomas)
Azurofilia	Violeta	Afinidade pelos corantes azures, sendo típica dos lisossomas (tipo de grânulo presente nos leucócitos)
Eosofilia	Rosa	Afinidade pelo corante ácido eosina, sendo uma característica particular da hemoglobina que ocupa o citoplasma eritrocitário.
Neutrofilia	Rosa salmão ou lilás	Afinidade por um corante designado anteriormente por neutro (apesar de não ser), sendo característica dos grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos.

Tabela 35

Contagem automática e manual: O estudo consiste na visualização da extensão de sangue periférico ao Microscópio ótico:

- Com a objetiva de menor amplitude (x10) é selecionada a área da extensão onde os eritrócitos estão em contato mas não haja sobreposição (1/3 final da extensão);
- Em seguida, com uma objetiva de maior ampliação (x40) e depois de adicionar uma gota de óleo de imersão para a realização da contagem, observa-se na objetiva de maior ampliação (x100). Com a ajuda de um contador de células é realizada a contagem de 100 leucócitos. Em simultâneo, são avaliadas as características morfológicas e cromáticas dos eritrócitos e das plaquetas. Na Ilustração 12 encontra-se representada a extensão de sangue periférico ideal,

com a indicação da disposição dos leucócitos ao longo desta e da zona ideal para a contagem (ideal thickness).⁽¹⁷⁾

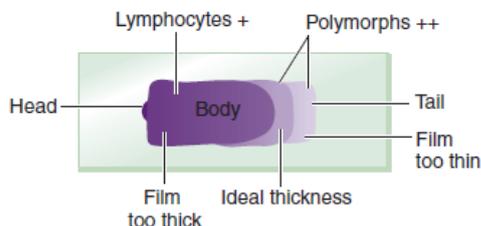


Ilustração 12

Na ilustração 13 encontra-se esquematizado o método para contagem leucocitária usado no CHSJ. A contagem pode ser realizada na zona A, que abrange a periferia e zona central ou na zona B, contando 50% no centro e 50% na zona mais próxima do bordo. No entanto, quando o número de células for reduzido há necessidade de percorrer a lâmina toda. Relativamente à rapidez com que se muda de campo, esta depende do número de leucócitos na amostra. Por exemplo, nas leucopenias as passagens devem ser mais lentas.⁽²¹⁾

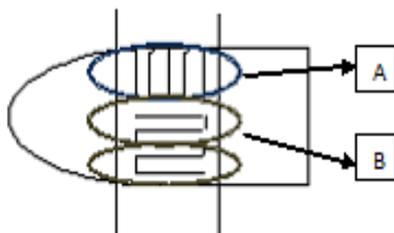


Ilustração 13

CONCLUSÃO

Após seis meses de estágio classifico a minha passagem pelo Serviço de Patologia Clínica do CHSJ como uma experiência muito gratificante e enriquecedora do ponto de vista da formação dos estagiários, uma vez que possibilitou o contacto com a dinâmica da atividade laboratorial em contexto hospitalar e, principalmente com realidades clínicas diversas.

Não obstante a elevada automatização do Serviço de Patologia Clínica, durante o estágio tive a oportunidade de manipular e processar vários produtos biológicos e, em algumas áreas, proceder à validação biopatológica dos resultados.

Fazendo uma análise retrospectiva, posso afirmar com veemência que os dados gerados pelo Serviço de Patologia Clínica apresentam uma importância clínica elevada, na medida em que diariamente este Serviço é solicitado para diversos doseamentos, necessários para sustentar a tese de diagnóstico clínico.

Sublinho como aspetos positivos a possibilidade de praticar as técnicas estudadas ao longo do Mestrado, conhecimentos adquiridos e a considerável integração do farmacêutico na equipa multidisciplinar deste Serviço. Apesar de curta duração do estágio, a excecional equipa deste Serviço integrou-me desde logo nas atividades, proporcionou-me momentos de partilha de informação e conhecimentos, fazendo perceber os procedimentos e a dinâmica das atividades, tornando, assim o estágio muito enriquecedor.

Por tudo, agradeço ao Professor Dr. Tiago Guimarães pela possibilidade de estágio.

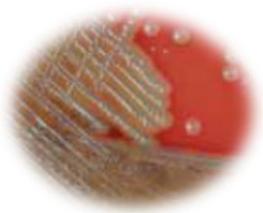
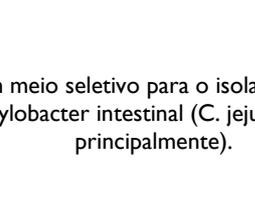
BIBLIOGRAFIA

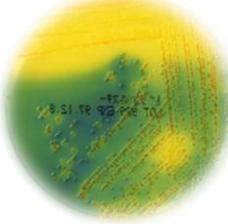
- (1) Richard A. McPherson, M. a. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 22nd Edition. Elsevier Saunders;
- (2) Betty A. Forbes, PhD (ABMM), F (AAM), Daniel F. Sahn, PhD(ABMM), F (AAM), et. al., Bailey Scott Diagnostic Microbiology, 12th Edition, Elsevier;
- (3) Standards for the management of sexually transmitted infections (STIs), Medical Foundation for HIV and Sexual Health, Revised and updated January 2014;
- (4) Bula BD BACTEC Instrumented Blood Culture System;
- (5) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, valid from 2016-01-01;
- (6) Dubois, Damien et al. - Performances of the Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry System for Rapid Identification of Bacteria in Routine Clinical Microbiology. *Journal of Clinical Microbiology*. 50,8 (2012) 2568–2576;
- (7) BioMérieux SA - VITEK® 2 AST Cards. Marcy-l'Étoile: bioMérieux SA, 2015. [Acedido a 20 de Maio de 2016]. Disponível na Internet: www.biomerieux.com;
- (8) Determination of minimum inhibitory concentrations, Department of Microbiology, City Hospital NHS Trust, Birmingham B18 7QH, UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2001) 48,. Suppl. S1, 5–16.;
- (9) Isenberg, *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, ASM, 2004;
- (10) Delurce Tadeu de Araujo Spada, et al., Evaluation of a genetic probe (Gen-Probe Accuprobe® system) in comparison to traditional methods for identifying members of the *M. tuberculosis* complex;
- (11) Rapid diagnostic tests. Department of Epidemic and Pandemic Alert and Response of the World Health Organization, May 2007;
- (12) F. A. Arosa; E. M. Cardoso; F. C. Pacheco. *Fundamentos de Imunologia*;
- (13) Dacie and Lewis *Practical Haematology*, Eleventh Edition;

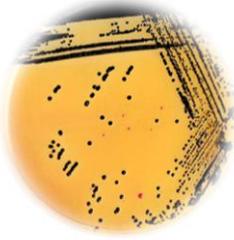
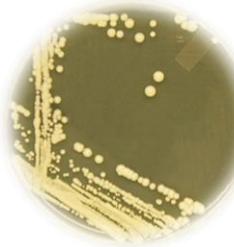
- (14) Direct Comparison of the Traditional and Reverse Syphilis Screening Algorithms in a Population with a Low Prevalence of Syphilis - Matthew J. Binnicker, Deborah J. Jespersen, and Leonard O. Rollins Division of Clinical Microbiology, Department of Laboratory Medicine and Pathology, College of Medicine, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA;
- (15) Kenneth Kaushansky, et. Al, Williams Haematology, 8th Edition;
- (16) Immature Myeloid Cell Detection (IMI, IG) as a Predictive Marker in Adult Sepsis - Axel Nierhaus.
- (17) Essential Haematology A.V Hoffbrand, P.A.H MOSS, 6th Edition;
- (18) Barbara J. Bain, A Beginner's Guide to Blood Cells, 2nd Edition Copyright © 1996, 2004 by Blackwell Publishing Ltd;
- (19) Heloise Pöckel Fernandes, et. Al, Electrical properties of the red blood cell membrane and immunohematological investigation, Rev Bras Hematol Hemoter. 2011; 33(4): 297–301;
- (20) J. M. JOURNAL, et. Al, ICSH review of the measurement of the erythrocyte sedimentation rate;
- (21) ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features.

ANEXOS

Anexo I - Meios de cultura

Meio de cultura	Componentes	Função principal
Bilis-esculina	Meio nutritivo com citrato férrico. A hidrólise de esculina pelos <i>Streptococcus</i> do grupo D leva à formação de esculina que reage com os iões ferro formando-se um precipitado que confere cor castanha escura ao meio. O desoxicolato de sódio inibe o crescimento de muitas bactérias de Gram positivo (com exceção do <i>Enterococcus spp.</i>).	Isolamento diferencial e identificação presuntiva de <i>Streptococcus</i> do grupo D (colónias escuras). 
Gelose de Sangue	Meio de Trispticase de soja com 5% de sangue de ovelha, que contém uma mistura de peptonas (crescimento de microrganismos fastidiosos), sendo nutritivo não seletivo. Isolamento diferencial pelo tipo de hemólise: . beta-hemólise/hemólise completa (um halo amarelo), alfa-hemólise/parcial (halo esverdeado) ou gama-hemólise (sem hemólise).	Colónias mais pequenas: cocos de Gram positivo Colónias grandes: bacilos de Gram negativo 
Gelose de Columbia	Contém 3 fontes de peptonas e 5% de sangue de ovelha desfibrinado. Permite a diferenciação de colónias bacterianas a partir do tipo de hemólise. Os antibióticos (colistina e ácido nalidíxico) permitem suprimir o crescimento da maioria dos bacilos de Gram negativo, enquanto que favorece o crescimento de Gram positivos.	Meio seletivo, diferencial e de isolamento de cocos de Gram positivos. 
Gelose de Chocolate	Meio essencialmente igual à Gelose de sangue, no exceto na fase de lise dos glóbulos brancos na etapa em que o meio é fundido. Esta lise liberta hemoglobina, fator X e V para o meio, sendo utilizados pelas bactérias fastidiosas .	Obtenção de isolados culturais de <i>Haemophilus spp.</i> e <i>Neisseria spp.</i> patogénicas (que não crescem em Gelose de sangue). 
Campyloset	Presença de sangue de carneiro que favorece o crescimento das espécies pesquisadas, agentes redutores (que aumentam a capacidade nutritiva), antibióticos e antifúngicos que tornam o meio seletivo.	É um meio seletivo para o isolamento de <i>Campylobacter</i> intestinal (<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> principalmente). 

		
<p>CLED (Cisteína Lactose Electrólitos em Deficiência)</p>	<p>Meio com lactose, fraco em electrólitos (previne a formação de swarming pelas espécies de <i>Proteus spp.</i>) e com o indicador de pH azul de bromotimol permite distinguir as bactérias fermentadoras não fermentadoras de lactose.</p>	<p>Importância no isolamento de microrganismos responsava por infeções do trato trato urinário. As bactérias lactose positivas produzem colónias amarelas ou amarelas pálidas por acidificação do meio.</p> <p>As bactérias que não fermentam a lactose produzem colónias verdes, azuis ou incolores.</p> 
<p>MacConkey</p>	<p>Meio primário seletivo e diferencial mais frequentemente usado. A base são peptonas e apresenta lactose. A presença de cristal violeta e sais biliares inibe o crescimento de bactérias de Gram positivo e fungos, e favorece o crescimento de alguns bacilos de Gram negativo. O indicador de pH, vermelho neutro, permite a diferenciação de fermentadores de não fermentadores de lactose, uma vez que na presença de fermentadores o pH diminui (com a produção de ácido) virando o indicador para a cor rosa ou vermelha. As colónias não fermentadoras, por exemplo do género <i>Shigella spp.</i> permanecem incolores/translucidas.</p>	<p>Isolamento diferencial de bacilos de Gram negativo fermentadores (colónias rosas) e não fermentadores de lactose (colónias incolores).</p> 
<p><i>Salmonella Shigella</i></p>	<p>Meio com base em peptonas, lactose, citrato férrico e de sódio. Os sais biliares e o verde brilhante inibem as bactérias coliformes. Como indicador de pH apresenta o vermelho neutro. Este meio possui ainda, a capacidade de detetar as bactérias que fermentam a lactose e que reduzem o tiosulfato (com produção de H₂S que reage com os iões ferro e forma um precipitado negro - colónias com um centro negro). Os microrganismos que fermentam a lactose produzem colónias rosa, sendo que os que não fermentam produzem colónias incolores.</p>	<p>É um meio seletivo e diferencial, recomendado para a deteção das espécies <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i>. Colónias não fermentadoras de lactose e produtoras de H₂S:</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ <i>Salmonella spp.</i> : incolores ou amarelo pálido, com centro negro; ○ <i>Proteus spp.</i>: com dimensões maiores que as de <i>Salmonella spp.</i>; <p>Colónias não fermentadoras de lactose nem produtoras de H₂S:</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ <i>Shigella spp.</i>: incolores, rosa pálido, ou alaranjadas sem centro negro. <p>Colónias fermentadoras de lactose: rosas (sem interesse clínico)</p>

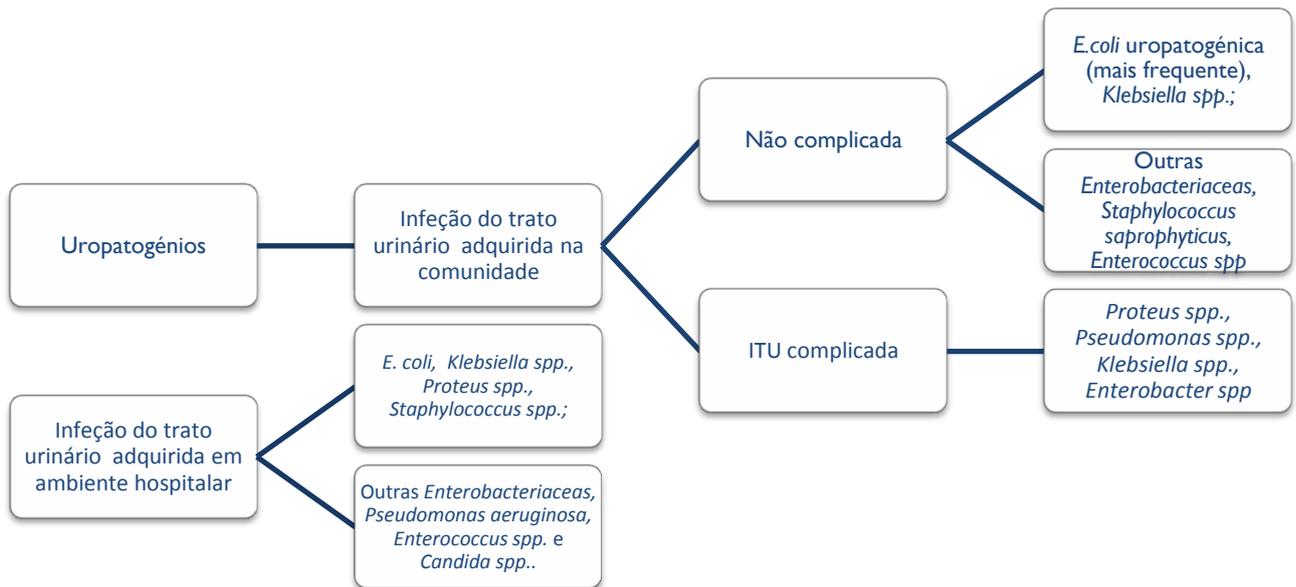
		
Yersinia	<p>Meio contém manitol e vermelho neutro que permite diferenciar os diferentes tipos pela coloração que apresentam (colónias rosa escuro a vermelho). Contém também colato, desoxicolato, cristal violeta, irgasan e antibióticos que inibem o crescimento de bactérias de Gram negativo e positivo. As colónias representativas da <i>Yersinia spp.</i> são incolores com centro colorido (“olho-de-bói”)</p>	<p>Meio de isolamento seletivo para a diferenciação de diversas espécies de <i>Yersinia spp.</i></p> 
Tetrionato	<p>Meio com peptonas, sais biliares e tiosulfato de sódio que inibem bactérias de Gram positivo e Enterobacteriaceae.</p>	<p>Seletividade para <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i></p>
Manitol Salgado	<p>Meio que tem na base peptonas, manitol e o indicador de pH vermelho de fenol. Apresenta uma concentração de sal de 7,5% que inibe a maioria das bactérias.</p>	<p>Meio seletivo de isolamento de <i>Staphylococcus spp.</i>. As colónias fermentadoras de manitol apresentam-se amarelas, sendo indicativo de <i>S.aureus</i></p> 
Sabouraud	<p>Contém peptonas, que são fontes de azoto e glicose (responsáveis pelo crescimento fúngico). O meio é considerado seletivo por conter altas concentrações de glicose, que é uma vantagem para o crescimento de fungos. A grande maioria das bactérias não consegue tolerar altas concentrações de açúcares e ainda um baixo pH, o que se verifica neste meio.</p>	<p>Meio seletivo para o isolamento e cultura de fungos. Colónias de <i>C. albicans</i></p> 
Granada	<p>Este meio é 100% específico para GBS e utiliza granadaene, um pigmento vermelho poliénico, para diferenciar GBS das outras espécies patogénicas. Este meio tem a capacidade de inibir todas as bactérias que não pertencem à espécie de <i>Streptococcus agalactiae</i> assim como leveduras e contém cristal violeta que inibe a produção de <i>Staphylococcus spp.</i></p>	<p>O meio Granada é um meio seletivo e diferencial que permite uma deteção fácil e rápida e a identificação de <i>Streptococcus agalactiae</i> (<i>Streptococcus</i> do grupo B, GBS). As colónias de <i>S. agalactiae</i> apresentam-se cor de laranja a cor salmão.</p>

		
<i>Brain-Heart Infusion</i>	Contém nutrientes de cérebro e coração, peptonas e dextrose. A peptona e a infusão são fontes de azoto, carbono, enxofre e vitaminas; enquanto a dextrose é o hidrato de carbono que os microrganismos fermentam para obtenção de energia.	É um meio de enriquecimento.
Tioglicolato	Contém caseína pancreática, meio de soja e glucose.	Meio de enriquecimento e de suporte para anaeróbios, aeróbios, microaerofílicos e bactérias fastidiosas (é o mais usado no diagnóstico bacteriológico).
<i>Todd-Hewitt</i>	Meio suplementado com ácido nalidixico e gentamicina/colistina .	Meio de enriquecimento e seletivo para <i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Mueller-Hinton</i>	A apresenta uma composição bem definida de extratos de carne e caseína, sais, cátions divalentes e amida solúvel que é necessária para a obtenção de resultados reprodutíveis.	O meio de cultura Mueller-Hinton é utilizado no procedimento normalizado de difusão de disco para a determinação de suscetibilidade de isolados de microrganismos aeróbios de rápido desenvolvimento aos agentes antimicrobianos.
Meio <i>Mueller-Hinton</i> 2+5% de sangue de ovelha	A suplementação com sangue de ovelha permite o crescimento de bactérias mais fastidiosas, sem interferir nos resultados. A baixa concentração de timina-timidina (inibidores de sulfonamidas) restringe o crescimento à volta dos discos, permitindo uma medida mais exata das zonas de inibição.	Meio utilizado para a determinação da suscetibilidade de <i>Pneumococcus</i> e outros <i>Streptococcus</i> .
<i>Haemophilus Test Medium</i>	Consiste na associação do meio Mueller-Hinton a suplementos de fator X e V, contendo também extrato de leveduras.	Utilizado para cultura e testes de suscetibilidade a <i>Haemophilus spp.</i>

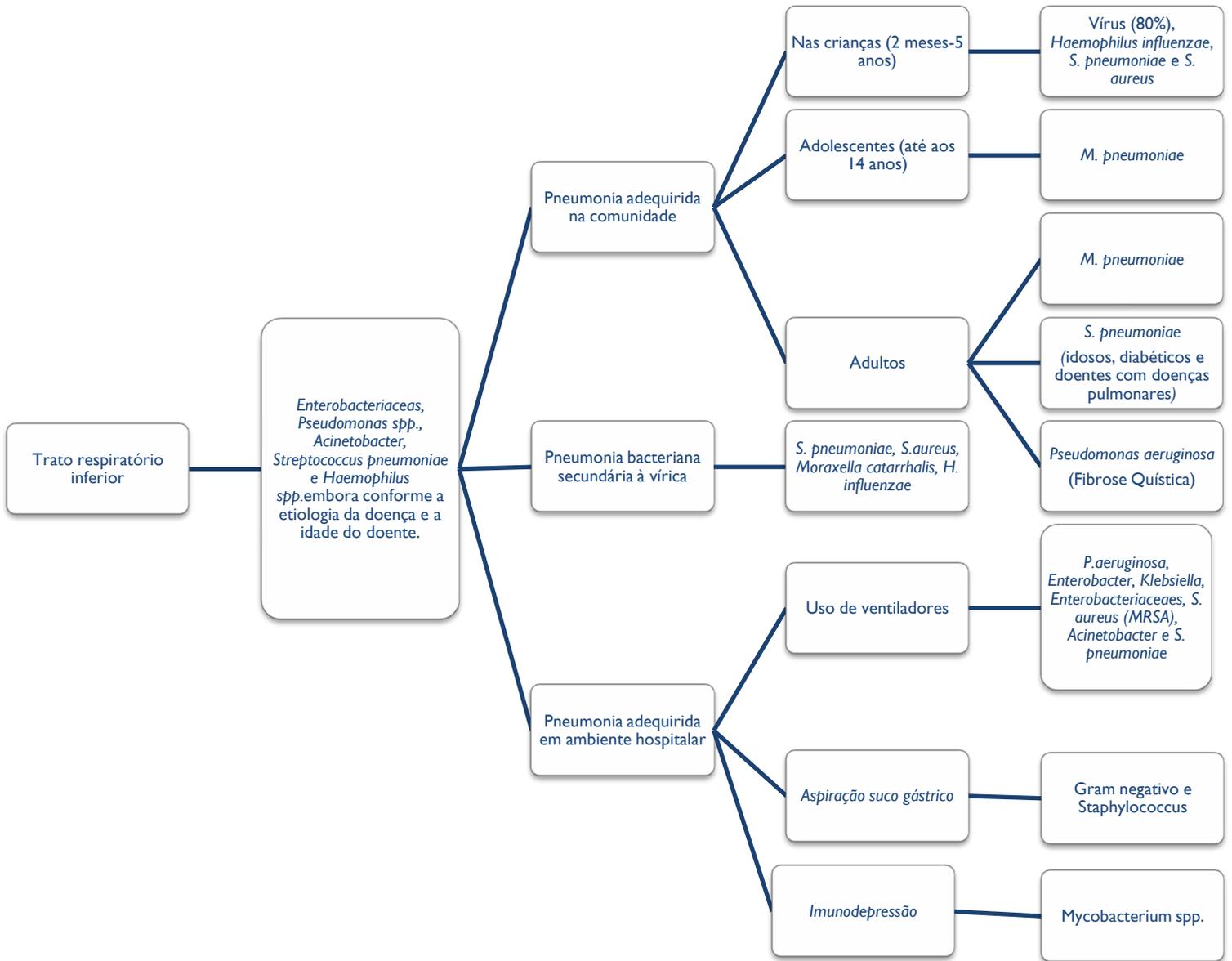
Anexo 2 - Técnicas de sementeira

Meios sólidos em placa de Petri		
Esgotamento do inóculo à superfície do meio sólido	Esta técnica é feita em 4 quadrantes. Com uma ansa estéril (de plástico descartável ou de metal) recolhe-se um pouco de inóculo e começa-se a estender no primeiro quadrante, seguindo-se os restantes quadrantes, aumentando o espaço entre as estrias de modo a obter colónias isoladas. se a ansa for de metal, esterilizar por carbonização do primeiro para o segundo e de novo do segundo para o terceiro quadrantes.	É uma técnica de diluição do inóculo, que permite o isolamento das colónias bacterianas. O resultado é semi-quantitativo: 1+ : reduzido crescimento, limitado ao primeiro quadrante 2+: crescimento moderado, estende-se ao segundo quadrante 3+ - 4+: crescimento abundante, estende-se ao terceiro e quarto quadrantes.
Quantitativa	Com uma ansa estéril descartável calibrada, traça-se uma linha longitudinal ao longo da superfície do meio e de seguida o estriamento desde o topo até à base (com as estrias progressivamente mais apertadas) tocando várias vezes na primeira linha longitudinal, produzindo colónias isoladas.	É uma técnica quantitativa que permite a contagem do número de unidades formadoras de colónias por mL de amostra, através do uso de uma ansa calibrada. Geralmente é aplicada em amostras de fluidos biológicos estéreis e urinas.
Rolamento	O cateter é colocado no centro do meio, sendo semiado por rolamento do segmento no meio sólido para trás e para a frente (4 vezes) com o auxílio de uma ansa estéril.	Esta técnica é usada para o exame cultural quantitativo, sendo o resultado valorizado quando o número de unidades formadoras de colónias for igual ou superior a 15.
Em toalha	Primeiro mergulha-se uma zaragatoa estéril numa suspensão (0,5 MacFarland) e retira-se o excesso nas paredes do tubo. Depois inocula-se o meio, rodando a zaragatoa, de modo a fazê-lo em duplicado em cada quadrante.	Técnica usada para a realização dos testes de suscetibilidade aos antibióticos, a qual permite obter-se um crescimento homogénio.
Por sectores	Com a ajuda de uma ansa estéril de 1 µL selecionar uma colónia isolada do meio de cultura primário, e depois estriar em duas ou mais direções perpendiculares (obtenção de um maior número de colónias).	Técnica que permite testar a sensibilidade de colónias alfa-hemolíticas à optoquina, para diagnóstico de <i>S.pneumoniae</i> (que apresenta sensibilidade a este agente).
Meios sólidos em tubo		
Picada central	Com uma ansa estéril recolher o produto a semiar e introduzir verticalmente no centro do meio de cultura, de seguida remover a ansa na mesma direção.	Geralmente são usadas em testes bioquímicos, na identificação das <i>Enterobacteriaceae</i> , ou na obtenção de isolados bacterianos puros para a identificação e determinação da sensibilidade aos agentes antibacterianos (por exemplo, o Meio de Trypticase de soja).
Estrias na rampa	Com uma ansa estéril recolher o produto a semiar e estriar o plano inclinado do meio, levemente.	
Meios líquidos		
Por dispersão	Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur introduzir a amostra por dispersão, libertando o conteúdo da pipeta contra a parede do tubo. Também pode ser realizado com recurso a uma ansa estéril descartável, no caso de amostras fecais em meio de tetrionato, por dispersão do produto na parede do tubo.	Técnica utilizada nos meios tioglicolato e caldo de carne, de modo a evitar a formação de bolhas de ar (não sendo homogeneizados) e na sementeira de brain-heart infusion, tetrionato e caldo de chocolate sendo estes homogeneizados por vórtex ou com a própria pipeta.

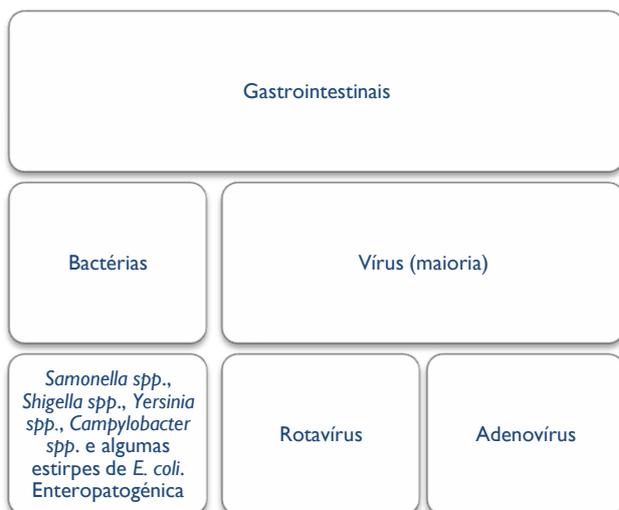
Anexo 3 – Uropatogénios



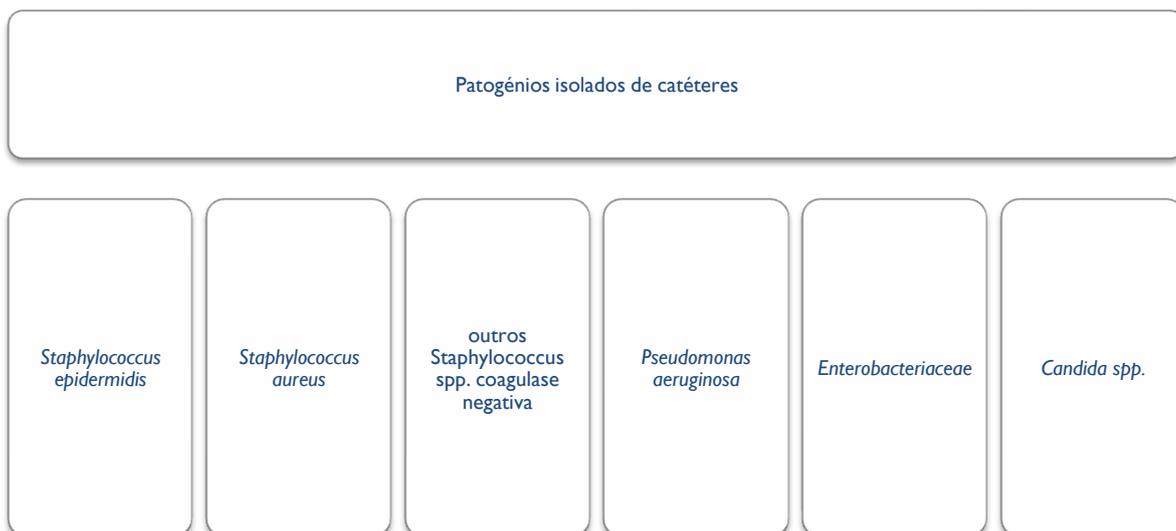
Axexo 4 – Patogénios do trato respiratório inferior



Anexo 5 – Patogénios Gastrointestinais



Anexo 6 – Patogénios isolados de Catéteres



Anexo 7 – Patógenos responsáveis por Meningites

Patógenos isolados de LCR			
Meningite Aguda			Meningite Crônica
Recém-nascidos	Até aos 6 anos	Adultos	M. tuberculosis (é a mais frequente) e fungos (Histoplasma capsulatum, B. dermatidis e Candida spp)
Streptococcus agalactiae, E.coli, outros bacilos de Gram negativo, Listeria monocitogenes	H. influenzae, N. meningitidis e S. pneumoniae	N. meningitidis, S. pneumoniae, L. monocitogenes, S.aureus e bacilos de Gram negativo	

Anexo 8 - Meios de cultura por tipo de Zaragatoa, condições de incubação e agentes etiológicos de interesse

Exsudado	Meios de cultura	Agentes etiológicos	Condições de Incubação
Nasal - Pesquisa de MRSA	Gelose de Sangue e Manitol Salgado.	Estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilino resistentes.	35±2°C, 24-48 horas, em atmosfera capnofílica, com observação após 24 horas.
Ferida pós-cirúrgicas	Gelose de sangue, MacConkey e Manitol Salgado.	Dependendo da localização da ferida podem ser isolados diferentes agentes etiológicos.	
Vaginal	Gelose de Sangue, Gelose de chocolate e Sabouraud (se pedido exame micológico)	<i>Gardnerella vaginalis</i> <i>Candida spp.</i>	35±2°C, 24-48 horas, em atmosfera capnofílica, com observação após 24 horas, caso do exame micológico, incubar a 25±2°C, 7 dias com observação diária.
Endocervical	Gelose de Sangue e Gelose de Chocolate	<i>N. gonorrhoeae</i>	35±2°C, 24-48 horas, em atmosfera capnofílica com observação após 24 horas
Vaginoretal - Pesquisa de <i>S. agalactiae</i>	Granada (sem ser por passagem de Todd Hewitt que é um meio com antibióticos usado para inibir o crescimento das bactérias da flora vaginal e promove o crescimento do <i>S. agalactiae</i>)	<i>S. agalactiae</i>	35±2°C, 24-48 horas (porque não há enriquecimento primário em Todd Hewitt)

Anexo 9 - Agentes etiológico de feridas pós-cirúrgicas

Staphylococcus aureus
Staphylococcus spp. Coagulase negativa
Streptococcus pyogenes
Enterococcus spp.
Proteus spp., Morganella spp., Providencia spp.
Escherichia coli
Pseudomonas spp.
Candida spp.

Anexo 10 – Patógenios envolvidos em Bacteriémias

Provável patógenio se: o mesmo microrganismo for isolado em mais que uma hemocultura obtida a partir de diferentes tempos de colheita e locais anatómicos, crescimento de microrganismos suspeitos a partir de doentes com endocardites (*Enterococcus spp.*) ou o isolamento de bacilos de Gram negativo a partir de doentes com histórico de sépsis por estes agentes causais, isolamento de comensais da microflora em hemocultura obtida de doentes com suspeita de bacteriemia (imunodeprimidos ou com catéter).

Provável contaminante se: bacteriemia for polimicrobiana e, principalmente, se obtida apenas numa das hemoculturas (é incomum); se a apresentação clínica e/ ou a evolução não é consistente com sépsis; houver discordância entre o agente causal isolado a partir de uma amostra de um local anatómico com infecção primária e o microrganismo a partir da hemocultura.

Microrganismos contaminantes: *Bacillus spp., Corynebacterium spp., Propionibacterium acnes* e *Staphylococcus spp.* coagulase negativa (se o crescimento for apenas numa das várias hemoculturas).

Patógenios mais frequentemente isolados: *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Staphylococcus spp.* coagulase negativa, *Enterococcus spp., Candida albicans, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Viridans streptococci, Streptococcus pneumoniae, Enterobacter cloacae, Proteus spp., Streptococcus agalactiae, Anaeróbios— Bacteroides spp. e Clostridium spp.*

Anexo 11 – Frascos de Hemoculturas

Tipo de hemocultura	Microrganismos isolados	Composição	Volume ótimo de amostra
BACTEC Peds Plus/F Culture Vials	Cultura e isolamento qualitativo de microrganismos aeróbios (bactérias e fungos) a partir de amostras pediátricas/ou outras de volume inferior a 3 mL	Água processada (40 mL), Meio líquido de soja-caseína digerido, extrato de leveduras, tecido animal digerido, piruvado de sódio, dextrose, sacarose, hemina, menadiona, Polianetossulfato de sódio, vitamina B6, resinas neutralizantes de antibióticos (absorvente não iónica e permutadora catiónica), enriquecido com CO ₂	1-3 mL
BACTEC Plus Aerobic/F Culture Vials e BACTEC Plus Anaerobic/F Culture Vials	Cultura e isolamento qualitativo de microrganismos aeróbios e anaeróbios.	Água processada (30 mL), Meio líquido de soja-caseína digerido, extrato de leveduras, tecido animal digerido, aminoácidos, açúcar, citrato de sódio, Polianetossulfato de sódio, vitaminas, antioxidantes/redutores, resinas neutralizantes de antibióticos (absorvente não iónica e permutadora catiónica), previamente reduzido e distribuído com CO ₂ e N ₂	8-10 mL
BACTEC Mycosis IC/F	Meio seletivo para cultura e isolamento de leveduras e fungos	Água processada (40 mL), Meio Líquido de Infusão Cérebro Coração, Meio Líquido de soja-caseína digerido, extrato de leveduras, sacarose, dextrose, m-inositol, citrato de amónia férrico, Polianetossulfato de sódio, saponina, cloranfenicol, tobramicina, agente anti-espuma, distribuído com CO ₂	8-10 mL
BACTEC Myco/F Lytic	Meio de cultura e não seletivo de isolamento de microrganismos aeróbios micobactérias, leveduras e fungos	Água processada (40 mL), Meio de Middlebrook 7H9 suplementado e Meio Líquido de Infusão Cérebro Coração, hidrolisado de caseína, suplemento H, isositol, glicerol, Polianetossulfato de sódio, Polisorbato 80, HCl piridoxal, citrato de amónia férrico, fosfato de potássio, saponina, anti-espuma, sendo distribuído com O ₂ e CO ₂	3-5 mL

Anexo 12 – Identificação de bactérias de Gram negativo

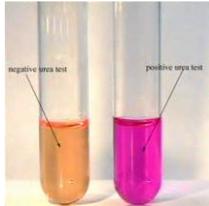
Teste da oxidase (Prova do metabolismo respiratório)



O teste da oxidase pesquisa a enzima citocromo oxidase (metaloproteína com um grupo heme presente em microrganismos aeróbios, microaerófilos e anaeróbios facultativos) que catalisa a transferência dos electrões da molécula hidrogénio para a molécula oxigénio que é o aceitador terminal na respiração aeróbia, com a formação de água. Permite identificar microrganismos sem esta enzima ou anaeróbios estritos. O teste da oxidase é realizado recorrendo ao composto tetrametil – p- fenilendiamina (incolore na forma reduzida e que substitui artificialmente a acção do oxigénio) que na presença da citocromo oxidase é oxidado e convertido em azul indofenol (azul de Wurster, com cor púrpura). Inicialmente é colocada uma gota do reagente tetrametil-p-fenilendiamina no papel de filtro (disposto numa placa de Petri) e de seguida, com auxílio de uma ança de plástico (pois os óxidos de ferro conduzem a falsos positivos devido ao poder oxidante), a colónia a ser testada é espalhada sobre o papel de filtro. Se aparecer uma coloração púrpura imediata (até 60 s pois o oxigénio atmosférico conduz a falsos positivos) significa que o microrganismo presente é oxidase positiva, portanto pertence à família *Pseudomonadaceas*, senão é oxidase negativa (família *Enterobacteriaceas*).

Teste da Urease (Prova do metabolismo proteico)

Este teste permite a pesquisa da enzima urease em meio de ureia que contém ureia, L-triptofano, tampão fosfato, glucose e o indicador de pH vermelho de fenol. Esta enzima é responsável pela hidrólise da ureia (diamina do ácido carbónico, resultante do metabolismo dos aminoácidos) em amónia e CO₂, segundo a seguinte reacção química $(\text{NH}_2)_2\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{NH}_3$. Dado que a amónia alcaliniza o meio, o vermelho de fenol liga-se aos iões HO⁻ provocando-lhe alteração da configuração electrónica e, conseqüentemente mudança da cor, observando-se a cor rosa cereja no meio. A técnica consiste na inoculação de colónias isoladas (com a ajuda de uma ansa) no meio de ureia, por estriação na rampa (geralmente apenas por picada central), sendo depois o meio incubado a 37°C durante 24 horas.



Urease positiva	Urease negativa
<i>Klebsiella spp.</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Proteus spp.</i>	<i>Shigella spp.</i>
<i>Yersinia spp.</i>	<i>Salmonella spp.</i>



Meio Kligler (Prova do metabolismo glucídico)

- O meio Kligler é um meio semi-inclinado complexo (1 g de glucose, 10 g lactose, citrato férrico amoniacal, tiosulfato de sódio e o indicador de pH vermelho de fenol) que permite o estudo da fermentação de hidratos de carbono (glucose e da lactose), produção de gás (CO₂ e H₂) e de tiosulfato de hidrogénio (H₂S), facilitando na identificação de *Enterobacteriaceas*. Este meio, no sector de Microbiologia Clínica é utilizado mais frequentemente para a identificação de *Salmonella* e *Shigella*. Esta técnica é feita através da inoculação do meio na zona direita em picada, e em estrias na zona inclinada, sendo o meio incubado a 37°C, durante 24 horas.
- Leitura da fermentação da glucose no plano vertical - A fermentação da glucose pela via glicolítica é detetada pela alteração da cor do meio (vermelho de fenol vira de vermelho para amarelo), devido ao abaixamento do pH com a formação de ácido pirúvico.
- Leitura da Fermentação da lactose no plano inclinado - Se a glucose se esgotar ao fim de 24 horas de incubação o meio fica todo amarelo, podendo haver a fermentação do dissacarídeo lactose (glucose + galactose), sendo necessárias duas enzimas a que permite a entrada da lactose nas células (galactosídeo permease) e a que hidrolisa a ligação galactosídica (galactosidase). Os fermentadores tardios da lactose não possuem a permease, sendo apenas possível a sua determinação através do teste ONPG que é um composto semelhante à lactose (onde o grupo nitrofenil substitui a glucose) que permite a deteção da galactosidade. Na ausência de fermentação de lactose, há oxidação de proteínas (que requer oxigénio), com formação de aminas que alcalinização – a zona inclinada surge vermelha e a direita amarela. Quando não ocorre fermentação de glucose nem de lactose até às 24 horas toda a extensão do tubo fica vermelha pois as proteínas são oxidadas.

- Produção de gás (CO₂ ou H₂): a fermentação é acompanhada de maior ou menor produção de gás que é detetada pela formação de bolhas ou mesmo fissuras na gelose. Formação de H₂S: o metabolismo de aminoácidos contendo enxofre (cisteína ou metionina) origina a formação de sulfureto de hidrogénio (H₂S). Como o meio de kligler contém peptonas ricas em cisteína e tiosulfato de sódio como substratos, as bactérias utilizam-nos como substrato produzindo H₂S que, ao reagir com citrato férrico amoniacal, origina um precipitado negro insolúvel (sulfureto ferroso). Na tabela seguinte encontram-se as bactérias produtoras de gás, fermentadoras da glucose, e lactose e as produtoras de H₂S.

Glucose positiva	Lactose positiva	Produtoras de gás	Produtoras de H ₂ S
Enterobacteriaceae	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>Proteus spp.</i>
	<i>Klebsiella spp.</i>	<i>Klebsiella spp.</i>	<i>Salmonella spp.</i>
	<i>Enterobacter spp.</i>	<i>Salmonella spp.</i>	
	<i>Citrobacter spp.</i>	<i>Citrobacter spp.</i>	
	<i>Serratia spp.</i>	<i>Enterobacter spp.</i>	
		<i>Proteus spp.</i>	

Anexo I3 – Identificação de cocos de Gram positivo

Teste da catalase



Em aerobiose, as bactérias utilizam normalmente o oxigénio como aceitador terminal de eletrões pela via oxidativa direta (fosforilação oxidativa). As flavoproteínas são autooxidáveis e os átomos de hidrogénio libertados fixam-se diretamente sobre o oxigénio molecular, levando à formação de peróxido de hidrogénio ou do ião superóxido. Estes acumulam-se nas células, sendo letais para as bactérias se não forem imediatamente degradados pelas enzimas superóxido dismutase e/ou catalase (superóxido dismutase: $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ e catalase: $H_2O_2 \rightarrow O_2 + H_2O$).

As bactérias aerotolerantes têm a superóxido dismutase, mas não têm catalase, enquanto as bactérias aeróbias facultativas têm ambas. Este teste é utilizado para a identificação de cocos de Gram positivo, permitindo diferenciar *Staphylococcus spp.* (catalase positiva) de *Streptococcus spp.* e *Enterococcus spp.* catalase negativos, sendo a positividade evidenciada pela formação de bolhas O₂ ou de efervescência. Para a realização do teste coloca-se uma gota de H₂O₂ numa lâmina, e com uma ansa de 1 µL retira-se um pouco de uma colónia isolada e mistura-se na gota de H₂O₂. Para a realização deste teste, as colónias testadas não podem ser retiradas de gelose de sangue por conzir a falsos positivos, uma vez que a catalase se encontra presente dos eritrócitos.

Teste da coagulase



A coagulase é uma enzima proteolítica que converte o fibrinogénio em fibrina, muito importante para distinguir as espécies *Staphylococcus spp.*. As espécies de *Staphylococcus aureus* libertam a enzima para o exterior, que no caso do plasma vai ativar a protrombina em trombina e secundariamente o fibrinogénio em fibrina, o que faz com que haja a formação de um coágulo. Para além deste tipo de coagulase livre que, 95% dos *Staphylococcus aureus* produzem uma outra substância que fica unida à célula, a coagulase ligada ao fator de agregação (clumping factor). Este fator de agregação (presente na suspensão bacteriana) quando em contacto com plasma reage directamente com o fibrinogénio, levando à aglutinação das bactérias *S. aureus*, macroscopicamente detectada pela visualização de grumos. O reagente da coagulase contém partículas de látex com anticorpos antipolissacarídeos (cápsula), anti-proteína A e anti fator de agregação contra *Staphylococcus*

aureus. Para a realização desta prova coloca-se uma gota do reagente *Pastourex Staph Plus® Bio-Rad* num disco e de seguida coloca-se uma colónia sobre a gota e verifica-se ou não a aglutinação. ⁽²⁾

Prova da Optoquina

A optoquina é uma substância que inibe o crescimento de *Streptococcus pneumoniae*, e esta prova tem como principal objetivo o estudo da sensibilidade a esta substância. Para a realização desta prova usa-se uma ansa estéril de 1 µL, e seleciona-se uma colónia bem isolada do microrganismo a ser testado (colónias α hemolíticas) e realizar uma sementeira em setores em meio Gelose de sangue. De seguida com a ajuda de uma pinça estéril, colocar um disco de optoquina no centro das áreas semeadas. Por fim incuba-se 18 a 24 horas a 37°C em atmosfera capnofílica. O aparecimento de uma zona de inibição igual ou superior a 14 milímetros, significa que a bactéria é sensível à optoquina, permitindo desta forma identificar *Streptococcus pneumoniae*.

Prova da Bacitracina

A Bacitracina é um agente antimicrobiano que inibe o crescimento *in vitro* do *Streptococcus β hemolítico* do grupo A. Para a realização desta prova usa-se uma ansa estéril de 1 µL, e seleciona-se uma colónia bem isolada do microrganismo a ser testado (colónias β hemolíticas) e realizar uma sementeira em setores em meio Gelose de sangue. De seguida com a ajuda de uma pinça estéril, colocar um disco de bacitracina no centro das áreas semeadas. Por fim incuba-se 18 a 24 horas a 37°C em atmosfera capnofílica. O aparecimento de uma zona de inibição igual ou superior a 14 milímetros, significa que a bactéria é sensível à bacitracina, permitindo desta forma identificar *Streptococcus* do grupo A.

Anexo 14 - Outras provas para a identificação microbiana (manuais)

Prova dos fatores proteicos de crescimento

Esta prova é utilizada para identificar o *Haemophilus*, uma vez que testa o seu comportamento *in vitro* relativamente a 2 fatores de crescimento: o fator X (hemina) e o fator V (NAD). As espécies de *Haemophilus* exigem estes fatores para o seu crescimento. O teste é realizado no meio de Muller-Hinton. São colocados 3 discos contendo, os fatores X, V e X+V sobre uma sementeira de 2 planos (direções diferentes) sobrepostos.

Soros de *Shigella ssp.*

É uma técnica de aglutinação em lâmina de vidro com anticorpos específicos para *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* e *Shigella sonnei*. Para a realização desta prova primeiro colocam-se os anticorpos existentes no kit (Izasa) numa lâmina de vidro. Com a ajuda de uma ansa de 1 µL estéril retira-se um pouco de inóculo do meio de cultura e homogeneizar com os diferentes antissoros. Ao mesmo tempo deve ser efetuado um controlo negativo com água esterilizada. No caso de se verificar aglutinação o resultado é positivo, o que significa que a amostra contém os antígenos de *Shigella*. Se não se verificar aglutinação, significa que o resultado é negativo e a amostra não contém os antígenos de *Shigella*. No caso de positividade com algum dos anticorpos, deve ser sempre testado os outros anticorpos para excluir falsos positivos.

Anexo 15 – Critérios para o Exame direto

Métodos de examinação de B-A-A-R			
Fluorocromo Auramina		Kinyoun	Relatório
Ampliação			
X250	X450	x1000	
0	0	0	B-A-A-R não visualizados
1-9 (10 campos)	2-18 (50 campos)	1-9 (100 campos)	1+
1-9 (por campo)	4-36 (10 campos)	1-9 (10 campos)	2+ (raros)
10-90 (por campo)	4-36 (por campo)	1-9 (por campo)	3+(alguns)
>90 (por campo)	>36 (por campo)	>9 (por campo)	4+(numerosos)

Anexo 16 – Unidades para a HbA_{1c}

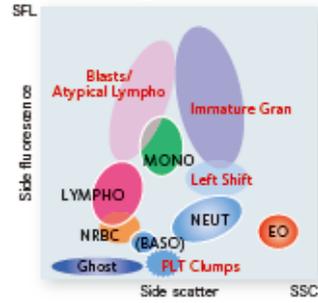
IFCC (mmol/mol)	NGSP (%)	mg/dL	mmol/L
31	5	97	5,4
42	6	126	7,0
53	7	154	8,6
64	8	183	10,2
75	9	212	11,8
86	10	240	13,4
97	11	269	14,9
108	12	298	16,5

Anexo 17 – Evolução da concentração da Hb com a idade

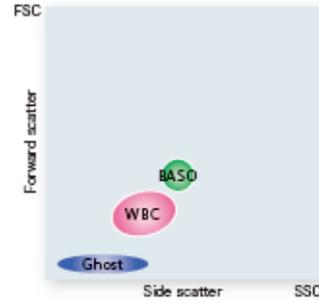
Idade	Hemoglobina F (%)	Hemoglobina A ₂ (%)
0-1 mês	63-84	0,0-2,5
1-2 meses	42-64	
3-4 meses	7,0-39	
5-6 meses	3,0-7,0	
7-12 Eses	0,6-2,6	1,5-2,9
>1 ano	<2,0	2,0-3,5

Anexo 18 – Scattergramas e histogramas

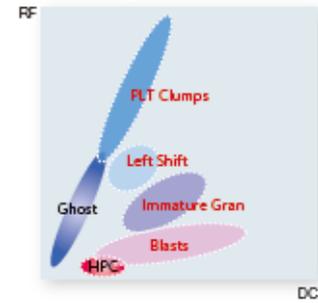
DIFF scattergram



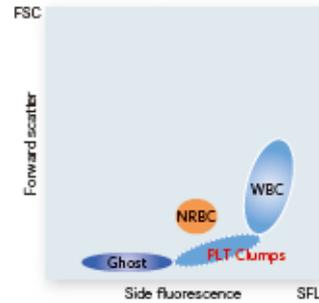
WBC/BASO scattergram



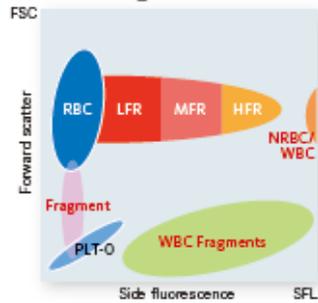
IMI scattergram



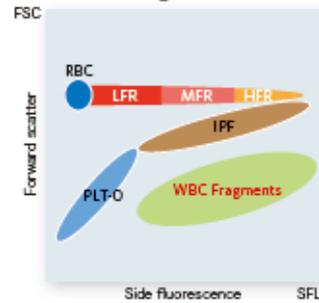
NRBC scattergram



RET scattergram



PLT-O scattergram



RBC histogram

PLT histogram

Anexo 19 – Valores de Referência de Hematologia (Serviço de Patologia Clínica, CHSJ)

HOSPITAL DE S. JOÃO E.P.E. - PORTO
SERVIÇO DE PATOLOGIA CLÍNICA – LABORATÓRIO DE HEMATOLOGIA
TABELA DE VALORES DE REFERÊNCIA DE HEMATOLOGIA

Parâmetros	0 - 1 dias	1 - 5 dias	6 - 8 dias	9 - 30 dias	1 - 6 meses	7 - 12 meses	1 - 3 anos	4 - 6 anos	7 - 9 anos	10 - 13 anos	Homem	Mulher*
Eritrócitos (x 10 ¹² /l)	4,8 - 7,6	4,6 - 6,8		4,7 - 5,9	3,4 - 4,8		3,8 - 5,2				4,5 - 5,5	3,8 - 4,8
Hemoglobina (g/dl)		15,0 - 23,0		16,0 - 20,0		10,0 - 16,0			12,0 - 16,0	14,0 - 16,0	13,0 - 17,0	12,0 - 15,0
Volume Globular (%)		48 - 76		48 - 64		30 - 46			37 - 47	40 - 48	40 - 50	36 - 46
Volume Corpuscular Médio (fl)		92 - 118			82 - 104	76 - 98			81 - 101			87 - 103
Hemoglobina Corpuscular Média (pg)		29 - 37			26 - 36	23 - 33			27 - 35			27 - 35
Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (g/dl)		27 - 37						29 - 37				28 - 36
RDW-CV (%)							11 - 16					
RDW-SD (fl)							37 - 54					
Plaquetas (x 10 ⁹ /l)		140 - 300		150 - 400		200 - 500		250 - 500				180 - 500
Leucócitos (x 10 ⁹ /l)	14,2 - 34,2	4,8 - 24,8		6,5 - 18,5		6,0 - 14,0		4,7 - 12,7		5,5 - 11,5		4,0 - 11,0
Neutrófilos (%)	52,6 - 86,6	36,3 - 80,3		18,0 - 58,0		13,1 - 49,1		32,2 - 62,2		40,9 - 64,9		53,8 - 69,8
Eosinófilos (%)	0,3 - 4,3	0,1 - 8,1		0,8 - 4,8		0,4 - 6,4		0,6 - 8,6		1,0 - 7,0		0,6 - 4,6
Basófilos (%)					0,0 - 1,0							0,0 - 1,5
Linfócitos (%)	5,4 - 35,4	8,6 - 48,6		27,7 - 67,7		39,2 - 75,2		27,1 - 55,1		25,3 - 47,3		22,6 - 36,6
Monócitos (%)	3,5 - 11,5	1,8 - 15,8		5,4 - 17,4		2,1 - 14,1		2,9 - 10,9		3,5 - 9,5		4,7 - 8,7
Neutrófilos (x10 ⁹ /l)	8,0 - 26,0	1,9 - 16,9		1,8 - 7,8		0,8 - 5,4		1,7 - 6,7		2,5 - 5,5		2,5 - 6,1
Eosinófilos (x10 ⁹ /l)	0,08 - 1,08				0,05 - 0,65			0,02 - 0,8				0,02 - 0,5
Basófilos (x10 ⁹ /l)					0,0 - 0,2							0,0 - 0,08
Linfócitos (x10 ⁹ /l)	1,7 - 7,7	1,1 - 7,1		3,0 - 9,0		2,9 - 8,5		1,75 - 5,35		1,7 - 3,7		1,0 - 3,0
Monócitos (x10 ⁹ /l)	0,8 - 2,8	0,3 - 2,1		0,4 - 2,4		0,2 - 1,5				0,2 - 1,0		
Reticulócitos (%)		1,6 - 8,3								0,5 - 1,5		
Reticulócitos (x10 ⁹ /l)		110 - 550 ?								50 - 100		
Velocidade de Sedimentação (1ª hora)			0 - 4					4 - 20			0 - 15 (<50 anos) 0 - 20 (>50 anos)	0 - 25 (<50 anos) 0 - 30 (>50 anos)

Idade	Hemoglobina F %	Hemoglobina A2 %
0 - 1 mês	63 - 84	
1 - 2 meses	42 - 64	0,0 - 2,5
3 - 4 meses	7,0 - 39	
5 - 6 meses	3,0 - 7,0	
7 - 12 meses	0,6 - 2,6	1,5 - 2,9
> 1 ano	< 2,0	2,0 - 3,5

Fragilidade osmótica dos eritrócitos

2,0 g/l NaCl	100 % lise
3,0	97 - 100
3,5	90 - 99
4,0	50 - 95
4,5	5 - 45
5,0	0 - 6
5,5	0
6,0	0
6,5	0
7,0	0
7,5	0
8,0	0
8,5	0

Fragilidade corpuscular média
4,0 - 4,45 g/l NaCl

Espermograma

Volume	2 - 6 ml
Cor	branco amarelado
pH	7,2 - 7,8
Aspecto	turvo
Coagulação	completa
Liquefação	completa
Viabilidade	> 50 %
Motilidade aos 30 "	> 40 % (progressiva)
Contagem	> 20 x 10 ⁶ /ml
Morfologia	> 15 % normais

Líquido	Células/μl	Neutrófilos %	Eritrócitos/μl
LCR Prematuro	<29		
0 - 1 mês	<32		
1 - 12 meses	<10	0 (Linfócitos e Monócitos)	0
1 - 4 anos	<8		
Adulto	<5		
Pleural	<1.000	<25	0
Peritoneal	<500	<25	<100.000
Pericárdico	<500	<25	0
Sinovial	<200	<25	0

Opil calculada dos células no liq.

3/3/2010 Cristina
feucina
do Al. ...