

Daniela Monteiro Marques

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Doutora Maria Eduarda Campos e pela Professora Doutora Maria do Céu Sousa e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Daniela Monteiro Marques

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Doutora Maria Eduarda Campos e pela Professora Doutora Maria do Céu Sousa e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

“A educação é o grande motor do desenvolvimento pessoal. É através dela que a filha de um camponês se torna médica, que o filho de um mineiro pode chegar a chefe de mina, que um filho de trabalhadores rurais pode chegar a presidente de uma grande nação.”

Nelson Mandela

Agradecimentos

A realização deste estágio é o capítulo final de mais uma etapa da minha vida, ultrapassada com o apoio de várias pessoas a quem quero deixar o meu apreço.

Primeiro que tudo, à professora doutora Leonor Almeida e ao Dr. Carlos Cortes, que permitiram a realização deste estágio.

Depois, a todos os profissionais do laboratório, que perderam um pouco do seu tempo para me explicarem todas as minhas dúvidas e me ensinarem como trabalhar num Laboratório de Análises Clínicas.

Um agradecimento especial à técnica Ana Paula por se ter disponibilizado sempre tão prontamente para me explicar tudo até ao mais ínfimo pormenor. Mais que uma professora, tornou-se uma amiga para manter.

Aos meus colegas de mestrado, que adorei conhecer e tive a felicidade de fazer grandes amigos para a vida.

Às amigas de toda a vida, por me aturarem quando precisava desabafar e por me fazerem rir.

Aos meus pais e ao meu irmão, pois sem eles nada disto era possível. Obrigada por sempre confiarem em mim e demonstrarem o vosso orgulho.

Ao meu namorado, pela compreensão e apoio que sempre me deu e por me animar quando mais precisava.

Índice

Índice de Abreviaturas.....	ix
Resumo	xiii
Abstract	xiii
1. Introdução	1
2. Caracterização do Laboratório	3
3. Atividades Desenvolvidas	5
3.1 Sala de Colheitas.....	5
3.2 Receção de Produtos.....	5
3.3 Setor Bioquímica/Imunologia.....	5
3.3.1 Circuito de Rotina.....	5
3.3.2 Autoimunidade.....	6
3.3.3 Técnicas Manuais.....	7
3.3.4 Sedimento Urinário.....	8
3.3.5 Controlo de Qualidade.....	8
3.4 Setor de Microbiologia.....	9
3.4.1 Sementeiras.....	9
3.4.2 Colorações.....	10
3.4.3 Produtos.....	11
Urina.....	11
Hemoculturas.....	12
Medula Óssea e LCR.....	12
Ponta de Cateter.....	13
Líquidos de Serosas.....	13
Exsudados/ Coleções Purulentas.....	13
Biópsias e Material de Próteses.....	15
Secreções Respiratórias.....	15
Fezes.....	15
3.4.4 Outros Meios.....	17
3.4.5 Provas de Identificação Bacteriana.....	18
3.4.6 Micobacteriologia.....	19
3.4.7 Parasitologia.....	21
3.4.8 Validação.....	22
3.4.9 Equipamentos.....	24
3.4.10 Controlo de Qualidade.....	28
3.5 Setor de Hematologia.....	31

3.5.1 Hemograma	31
Parâmetros Eritrocitários	32
Parâmetros Leucocitários	35
Parâmetros Plaquetares	37
3.5.2 Velocidade de Sedimentação	38
3.5.3 Hemostase	38
3.5.4 Frações da hemoglobina	42
3.5.5 Eletroforese da Hemoglobina.....	43
3.5.6 Contagem de Células – Líquidos Biológicos	44
3.5.7 Validação	46
3.5.8 Controlo de Qualidade	47
4. Conclusão	49
5. Bibliografia.....	51

Índice de Abreviaturas

Ac – Anticorpo

ACTH – *Adrenocorticotropic Hormone*

ADA – Adenosina Desaminase

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

AEQ – Avaliação Externa da Qualidade

AES – *Advanced Expert System*

AL – Anticoagulante Lúpico

ALT – Alanina Aminotransferase

ALP – *Alkaline Phosphatase*

AMA – Anticorpos Anti Mitocôndria

ANA's – Anticorpos Anti-nucleares

ANCA's – Anticorpo Anti-citoplasma de Neutrófilos

aPTT – *Activated Partial Thromboplastin Time*

ARN – Ácido Ribonucleico

AST – Aspartato Aminotransferase

ASMA – Anticorpo Anti Músculo Liso Actina

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATG – Anticorpos Anti-tiroglobulina

ATPO – Anticorpo Anti Peroxidase

BAAR – Bacilos ácido-álcool resistentes

BHI – *Brain-Heart Infusion*

BK – Bacilo de Koch

CA 125 – *Carbohydrate antigen 125*

CA 15.3 – *Carbohydrate antigen 15.3*

CA 19.9 – *Carbohydrate antigen 19.9*

CAMPY – Gelose Campyloset

CARBA – Meio Cromogénico para deteção de Enterobactérias produtoras de carbapenemases

CEA – *Carcinoembryonic Antigen*

CH50 – Proteína do complemento

CK – *Creatine Kinase*

CK-MB – *Creatine Kinase MB*

CLED – Cistina, lactose, défice em eletrólitos

CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

CMI – Concentração Mínima Inibitória

CMV – Citomegalovírus

CNA – *Colistin e Nalidixic Acid*

CQE – Controlo de Qualidade Externo

CQI – Controlo de Qualidade Interno

EBV – Epstein-Barr Vírus

EDTA – *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ELFA – *Enzyme Linked Fluorescent Assay*

ESBL – *Extended Spectrum β -lactamases*

ESP – Esfregaço Sangue Periférico

EUCAST – *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FSH – *Follicle-stimulating Hormone*

FvW – Fator von Willebrand

GDH – *Glutamate Dehydrogenase*

GGT – Gama Glutamil Transferase

GN – Gram Negativo

GP – Gram Positivo

GS – Gelose de Sangue

HAE – Gelose *Haemophilis spp*

Hb – Hemoglobina

HbA1c – Hemoglobina Glicada

HbF – Hemoglobina Fetal

HEK – Hektoen

HCM – Hemoglobina Corpuscular Média

HT – Hematócrito

IFCC – *International Federation of Clinical Chemistry*

IG – *Immature Granulocytes*

Ig – Imunoglobulina

INR – *International Normalized Ratio*

INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

ISI – Índice de Sensibilidade Internacional

LCR – Líquido Cefalorraquídeo

LDH – *Lactate Dehydrogenase*

LH – *Luteinizing Hormone*

MAC – Gelose MacConkey

McF – McFarland

MIN – Minutos

MPC – Médico Patologista Clínico

MPO – Mieloperoxidase

MRSA – *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

NSE – *Neuron-specific Enolase*

NSGP – *National Glycohemoglobin Standardization Program*

NH – *Neisseria spp e Haemophilus spp*

PCR – Proteína –C reactiva

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PDW – *Platelet Distribution Width*

PNAEQ-INSA – Programa Nacional da Avaliação Externa da Qualidade do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

PR3 – Proteinase 3

PSA – *Prostate Specific Antigen*

PTH – *Parathyroid hormone*

PVX – PolyViteX

RBC – *Red Blood Cells*

RDW – *Red Cell Distribution Width*

Real time-PCR – *Real Time–Polymerase Chain Reaction*

RIQAS – *Randox International Quality Assessment Scheme*

RPM – Rotações Por Minuto

RT – PCR – *Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*

SGC – Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol

Seg – Segundos

SPC – Serviço de Patologia Clínica

T3 – Triiodotironina

T4 – Tiroxina

TASO – Título Anti Estreptolisina O

TP – Tempo de Protrombina

TSA – Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

TSH – *Thyroid Stimulating Hormone*

TSS – Técnico Superior de Saúde

TT – Tempo de Trombina

TVVRd – Tempo do Veneno da Víbora de Russel diluído

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

UK-NEQAS – *United Kingdom National External Quality Assessment Service*

VCAT – Vancomicina, Colistina, Anfotericina, Trimetoprim

VCM – Volume Corpuscular Médio

VPM – Volume Plaquetar Médio

VS – Velocidade de Sedimentação

WBC – *White Blood Cells*

YER – Gelose *Yersinia spp*

YST – *Yeast*

Resumo

O presente relatório do estágio curricular do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pretende relatar todas as atividades em que estive envolvida durante o estágio efetuado na Unidade Hospitalar de Tomar do Centro Hospitalar Médio Tejo, nas áreas de Microbiologia, Hematologia, Bioquímica e Imunologia, dando ênfase às primeiras duas. Após uma breve caracterização do Centro Hospitalar, são mencionadas as atividades desenvolvidas em cada um dos setores, com o devido enquadramento teórico, desde a pré analítica até à pós analítica. São também referidos os equipamentos presentes no Serviço de Patologia e é feita uma breve descrição do Controlo de Qualidade Interno e Externo. Na conclusão do relatório é apresentada uma apreciação geral ao estágio.

Abstract

The present report of the internship of the Master in Clinical Analysis, Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra intends to report all activities in which I was involved during the internship performed in Centro Hospitalar Médio Tejo, unity of Tomar, in the areas of Microbiology, Hematology, Biochemistry and Immunology, with emphasis on the first two. After a brief characterization of the Hospital, the activities developed in each of the sectors are mentioned, with appropriate theoretical framework, from pre analytic to the post analytic. It is also referred the equipment in the Pathology Service and is made a brief description of the Internal and External Quality Control. At the conclusion of the report, is presented a general appreciation to the internship.

I. Introdução

Após terminar a licenciatura em Biologia, pela Universidade de Coimbra, achei que a minha formação não era suficientemente específica e decidi enriquecer o meu conhecimento ao realizar o Mestrado em Análises Clínicas, na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pois o plano de estudos engloba as áreas que mais apreciei na licenciatura, sendo agora mais aprofundadas, ficando assim com a formação desejada inicialmente.

Para além da formação teórica multidisciplinar, o plano de estudos deste mestrado integra um estágio de seis meses, que nos permite colocar em prática as valências adquiridas nas aulas teóricas e práticas e ficar habilitados a trabalhar em qualquer laboratório de análises clínicas.

O relatório apresentado é relativo ao estágio realizado no Serviço de Patologia Clínica (SPC) da Unidade Hospitalar de Tomar, do Centro Hospitalar Médio Tejo (CHMT). Durante o estágio estive integrada nas quatro áreas pretendidas (Microbiologia, Hematologia, Bioquímica e Imunologia), estando cerca de dois meses em cada uma e cujas atividades desenvolvidas estão descritas neste relatório. As áreas de Microbiologia e Hematologia foram as escolhidas para aprofundamento, estando por isso descritas mais detalhadamente.

2. Caracterização do Laboratório

O meu estágio foi realizado no Serviço de Patologia Clínica (SPC) da unidade de Tomar do Centro Hospitalar Médio Tejo (CHMT), situado na Av. Maria de Lurdes Mello Castro, 2304-909 Tomar. O serviço é dirigido pelo Dr. Carlos Cortes.

O CHMT é composto por três unidades hospitalares, localizadas em Tomar, Torres Novas e Abrantes e tem uma área de influência que engloba 15 concelhos, servindo uma população de cerca de 266 mil habitantes [<http://www.chmt.minsaude.pt/chmt/CentroHospitalar/Apresentacao>]. Na unidade de Tomar está centralizado o laboratório de patologia clínica, no entanto, existem laboratórios de urgência e apoio à rotina nas outras unidades hospitalares. As amostras que têm pedidas análises que não são realizadas em Abrantes e Torres Novas, são enviadas para Tomar, sendo que o envio fica a cargo das outras unidades e é feito por transporte específico entre unidades, em que as amostras são acondicionadas em malas térmicas, com as devidas condições de identificação, segurança e temperatura. Para além das amostras recebidas das outras unidades, o Laboratório Central do SPC tem uma sala de colheitas e recebe as amostras da urgência e internamento hospitalar.

A carga total de trabalho das três unidades do SPC é de cerca de 1.354.814 provas/ano, sendo que a unidade de Tomar realiza mais de um terço das provas, cerca de 619.624/ano. Todas as amostras recebidas são registadas no sistema informático *ModuLab* e distribuídas pelos respetivos setores. O sistema informático regista todas as ações realizadas, incluindo o técnico que recebeu a amostra e é de extrema importância na rastreabilidade das amostras.

O SPC é composto pelos setores de Microbiologia, Hematologia, Bioquímica e Imunologia. Por conveniência, os setores de Bioquímica e Imunologia estão agrupados sendo designados por setor de Imunoquímica. A validação dos resultados é feita pelos Técnicos Superiores de Saúde e/ou pelos Médicos Patologistas Clínicos (MPC).

O SPC está certificado pela Norma NP EN ISO 9001:2008, tem um programa de Controlo de Qualidade Interno (CQI) e participa em programas de Avaliação Externa de Qualidade (AEQ), que permitem a comparação de resultados com outros laboratórios e perceber se é necessário fazer algum tipo de correção à forma de trabalho do laboratório. O controlo externo de qualidade pode ser mensal, trimestral ou semestral e existe em todos os setores.

Na tabela I estão indicados os equipamentos presentes no SPC, distribuídos por setor.

Tabela I. Equipamentos utilizados em cada setor.

<i>Setor</i>	<i>Equipamento</i>
<i>Microbiologia</i>	Microscan Walkaway [®] 96 da Beckman and Coulter
	Vitek 2 [™] Compact da Biomérieux
	Bactec 9120 da Quilaban
	Bactec 9000MB da Quilaban
	GeneXpert [®] da Werfen
	PolyStainer
<i>Hematologia</i>	Sysmex XE-2100 da Emílio Azevedo Campos
	Sysmex XT-I800i da Emílio Azevedo Campos (Back Up)
	STA [®] Compact MAX (x2) da Stago
	Test I [®] THL da Emílio Azevedo Campos
	VARIANT [™] II da BioRad
	Hydrasys Sebia da ThermoFisher
	RALStainer da RAL Diagnostics
<i>Bioquímica/ Imunologia</i>	SYNCHRON DxC [®] 800 (x2) da Beckman and Coulter
	Access [®] 2 Immunoassay System da Beckman and Coulter
	GEM Premier 3000 da Werfen
	Aution Max AX42-80 da Menarini
	UniCel Dxl 800 [®] da Beckman and Coulter
	IMAGE [®] da Beckman and Coulter
	VIDAS [®] da Biomérieux
	MAGO Plus da Isoder
	ImmunoCAP [™] 250 da ThermoFisher
	Hydrasys Sebia da ThermoFisher
	EUROBlotMaster da EuroImmun

3. Atividades Desenvolvidas

3.1 Sala de Colheitas

O meu estágio teve início na sala de colheitas, onde tive a oportunidade de aprender a fazer colheitas pela técnica do vácuo. Quis aproveitar esta oportunidade pois sei que irá enriquecer muito a minha formação que fica mais diversificada. Foi importante iniciar o estágio pelas colheitas, para poder estar em contato com o tipo de amostras que o laboratório recebe, pois o grande volume de amostras processadas são de soro e sangue total, seguindo-se as urinas.

3.2 Receção de Produtos

Depois da sala de colheitas, fui integrada na receção de produtos. Esta fase pré-analítica é uma das mais importantes no processo analítico. As amostras são divididas pelos devidos setores, tendo em conta os dias em que são realizadas as análises para poder fazer as alíquotas necessárias. Os tubos primários e as alíquotas vão diretamente para os equipamentos ou são refrigerados ou congelados, dependendo da estabilidade da amostra e de que dia irá ser feita a análise. A divisão em alíquotas é de extrema importância, pois é necessário garantir que há amostra suficiente para todas as análises pedidas e que a estabilidade da amostra será garantida no dia que for feita a análise.

Nesta fase que são aplicados os critérios de rejeição de amostras. Por exemplo, amostras mal-acondicionadas e/ou amostras hemolisadas são rejeitadas e é colocada uma ocorrência no sistema informático com a justificação da rejeição e com pedido de nova amostra.

3.3 Setor Bioquímica/Imunologia

O primeiro setor onde fui integrada foi o de Bioquímica que funciona em conjunto com o de Imunologia. No Anexo I, estão todos os equipamentos e os parâmetros analisados neste setor com os respetivos valores de referência, quando aplicáveis. É também neste setor que se desenvolve a autoimunidade e onde se realizam as técnicas manuais de serologia e são observados os sedimentos urinários.

3.3.1 Circuito de Rotina

Existem no laboratório os circuitos de urgência e de rotina, que funcionam em paralelo. No meu estágio, participei mais ativamente no circuito de rotina, acompanhando todo o percurso das amostras, desde a receção até este setor. Apesar de ter observado o funcionamento de todos os equipamentos deste setor, estive mais envolvida com os

equipamentos UniCel Dxl 800[®], VIDAS, EuroBlotMaster e MAGO Plus, participando na colocação dos controlos, programação do equipamento e colocação de amostras. No UniCel Dxl 800[®], a amostra utilizada é o soro e são avaliadas as hormonas da fertilidade, hormonas tiroideas, marcadores tumorais, entre outras, por imunoensaio quimioluminiscente. O equipamento VIDAS faz a pesquisa de anticorpos (IgM e IgG) contra vírus e parasitas, que permitem saber se o utente está ou já esteve infetado por exemplo, com o Citomegalovírus, da família do Herpes vírus que provoca citomegalovirose e é preocupante nas mulheres grávidas, Vírus da Rubéola, Vírus Epstein Barr e também pelo parasita *Toxoplasma gondii*, que é preocupante também nas mulheres grávidas, devido à toxoplasmose.

Após serem retiradas dos equipamentos as amostras são guardadas no frigorífico das amostras processadas, durante duas semanas, no mínimo, para que caso seja necessário fazer alguma repetição, a amostra esteja disponível.

3.3.2 Autoimunidade

As doenças autoimunes são caracterizadas pela produção de anticorpos contra componentes do nosso próprio organismo. Muitas vezes não está explicada a origem, nem o porquê deste “ataque” ao que é próprio, mas cada vez mais são descobertas patologias que têm por base este mecanismo. No SPC, são pesquisados autoanticorpos e anticorpos por duas técnicas, Imunofluorescência Indireta (IFI) e por ELISA, usando como amostra o soro.

Na autoimunidade, tive a oportunidade de colaborar na realização de todos os testes de pesquisa de anticorpos que são efetuados no laboratório (Tabela 2), desde a seleção das amostras tendo em conta as listas de trabalho, à programação do equipamento MAGO Plus, que realiza IFI e ELSA em simultâneo, e à interpretação de resultados. Nos testes que são realizados por Imunofluorescência Indireta, observei lâminas por microscopia de fluorescência. O equipamento MAGO Plus realiza também pesquisa e doseamento de anticorpos que não são autoanticorpos (Tabela 2).

Tabela 2. Testes realizados no equipamento MAGO Plus.

Pesquisa de ANA's (Anticorpos Anti Nucleares e Citoplasmáticos) por IFI e ELISA
Pesquisa de ANCA's (Anticorpos Anti Citoplasma do Neutrófilo) por IFI
Pesquisa de Anticorpos Anti Fosfolípidos (IgG, IgM) por ELISA
Pesquisa de ASMA (Anticorpos Anti Músculo Liso-Actina) por IFI e ELISA
Pesquisa de AMA (Anticorpos Anti Mitocôndrias) por IFI e ELISA
Pesquisa de Anticorpos Anti <i>Mycoplasma pneumoniae</i> (IgG, IgM)* por ELISA
Pesquisa de Anticorpos Anti <i>Chlamidophila pneumoniae</i> (IgG, IgM)* por ELISA
Doseamento Aldosterona* por ELISA
Doseamento NSE (Neuron-Specific Enolase)* por ELISA

*Não são autoanticorpos.

Nesta área, o tempo de resposta do laboratório tem de ser alargado, comparando com outras análises, pois, devido ao custo dos testes, é necessário reunir um número de amostras que justifique a realização do teste e porque a validação dos resultados é mais morosa pois têm de ser observadas as lâminas e por vezes pedir testes confirmatórios como *ImunoBlots*, *ImunoDot* ou doseamentos específicos.

3.3.3 Técnicas Manuais

É neste setor que se realizam as técnicas de serologia manual (Tabela 3) e os testes rápidos imunocromatográficos de deteção de drogas com o *SureStep™ Multi-Drug* e testes de gravidez com pesquisa de β -hCG com o *SureStep™ One Step hCG Pregnancy Test*.

Tabela 3. Técnicas de serologia manual efetuadas no laboratório e doenças associadas.

Reação de Rosa Bengala	Brucelose [1]
Reação de Huddleson/Wright	Brucelose [1]
Reação de Waller-Rose	Artrite Reumatoide (Fator Reumatoide)
Reação de Weil-Félix	Febre Escaro Nodular – <i>Ricketzia conorii</i> [1]
Reação de Widal-Félix	Febre tifóide – <i>Salmonella tiphy</i> [1]
Reação de Paul-Bunell	Mononucleose [2]
Pesquisa de <i>Ac. Echinococcus granulosus</i>	Hidatidose

3.3.4 Sedimento Urinário

A partir do sedimento urinário obtém-se informações importantes, como por exemplo, a quantidade de leucócitos, que em grande número são um sinal de infecção. A observação do sedimento obtido após centrifugação da urina durante 10 minutos a 1500 rpm é realizada entre lâmina e lamela, no microscópio com a objetiva de 40x. Leucócitos, eritrócitos, células epiteliais, cilindros e cristais são procurados no sedimento urinário e caso se encontrem são quantificados por campo. Todos os resultados são inseridos no sistema informático e servem de apoio a outros setores, como o de microbiologia na validação de culturas urinárias.

3.3.5 Controle de Qualidade

Neste setor, o CQI passa por colocar, todos os dias, os controles necessários, fazer as manutenções e preparar os equipamentos para o dia seguinte. Para análises diárias, são colocados dois níveis de controle e para análises que são feitas semanalmente são colocados três níveis, de acordo com as instruções de trabalho definidas pelo SPC. Os resultados dos controles são colocados nas cartas de controle Levey-Jennings e são avaliados de acordo com as Regras de Westgard [3], para serem ou não aceites pelo responsável do setor. Para além disso, o CQI é também realizado sempre que é necessário abrir um novo lote de reagente, ou sempre que é feita uma nova calibração, ou manutenção do equipamento.

3.4 Setor de Microbiologia

Este foi o segundo setor onde estive integrada, é composto por três salas distintas, uma onde é feita a validação, outra onde é realizado todo o trabalho de bancada (sementeiras, repicagens, etc.), onde são guardadas as amostras recebidas após processamento e onde se encontram as estufas necessárias ao crescimento de microrganismos. A terceira sala é unicamente para inoculação e cultura de amostras com pedido de pesquisa de bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR) e hemoculturas.

Os produtos para este setor não são recebidos na sala de recepção de produtos. Por conveniência, recebe-se estes produtos no próprio setor de microbiologia, onde são aplicados de maneira rigorosa, os critérios de rejeição de amostras. É sempre dada prioridade às amostras que não estão em meio de transporte, quer na recepção, quer no processamento.

Quando é feita a recepção, são impressas etiquetas, com os dados e número de pedido do utente, indispensáveis para a identificação de todas as placas de meios de cultura necessários para o processamento do produto recebido. A minha permanência neste setor teve início nesta etapa, seguindo-se o trabalho de bancada, onde realizei o processamento de todo o tipo de amostras que chegam ao laboratório e terminou na sala de validação.

Em termos de equipamentos, este setor possui três câmaras de fluxo laminar, quatro estufas com diferentes ambientes (aerobiose a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, aerobiose + CO_2 $35 \pm 2^\circ\text{C}$, estufa a 42°C específica para *Campylobacter* spp. e estufa para as garrafas de hemoculturas positivas a $30 \pm 2^\circ\text{C}$), um corador de lâminas automático (PolyStainer), dois equipamentos para identificação e antibiograma (MicroScan Walkaway[®] 96 e Vitek[™] Compact 2), um equipamento para hemoculturas (Bactec 9120), um equipamento para cultura de BAAR (Bactec 9000MB) e um equipamento para análises por PCR (GeneXpert[™]) (Anexo II). Ao longo do relatório irei referir-me mais pormenorizadamente a alguns deles.

3.4.1 Sementeiras

Os meios são semeados do menos para o mais seletivo. Em todos os meios sólidos, exceto os cromogénicos, é usada a sementeira para isolamento de colónias, em quadrantes ou roseta (Fig. 1A). Nos meios cromogénicos ChromID MRSA e ChromID Strepto B, é usada a sementeira por espalhamento com zaragatoa (Fig. 1B) pois o objetivo é qualitativo, ou seja, perceber se o microrganismo está ou não presente. Apenas para a urina é usada a sementeira para quantificação de colónias, com uma ansa calibrada (Fig. 1C). Nos meios

líquidos, a inoculação é feita adicionando o produto ao meio. Quando o produto vem em zaragatoa, é semeado de acordo com a natureza do produto.

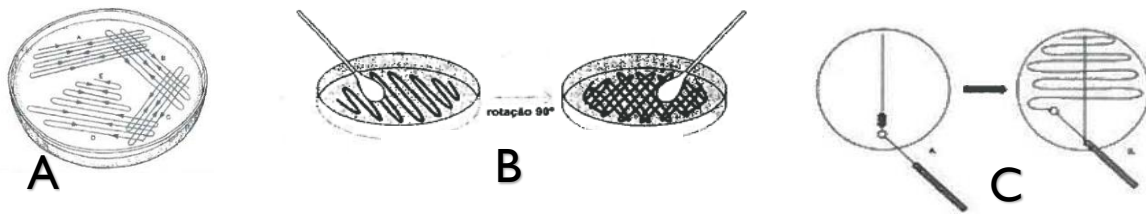


Figura 1. Ilustração dos vários tipos de sementeiras [4].

3.4.2 Colorações

As colorações são um passo de extrema importância para verificar a qualidade de uma amostra e para a validação de um resultado. A coloração de Gram permite detetar a presença de cocos e/ou bacilos positivos ou negativos que coram de roxo ou rosa, respetivamente (Fig. 2A e 2B). A informação preliminar retirada da coloração de Gram indica também a qualidade da amostra, dirige o técnico para a identificação do microrganismo e deve ser reportada ao clínico. As colorações de Ziehl Neelsen Modificada e por Auramina permitem observar BAAR. Na primeira, o campo fica com um fundo azul e os BAAR ficam com cor vermelha (Fig. 2C), na segunda, a observação é feita por microscopia de fluorescência, o corante fluorescente é a Auramina O e os BAAR ficam com fluorescência verde-amarelada [5] (Fig. 2D).

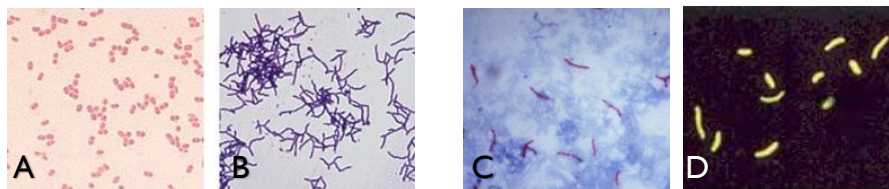


Figura 2. Bactérias Gram negativo (A); Bactérias Gram positivo (B); BAAR corados por Ziehl Neelsen Modificada (C); BAAR corados por Auramina (D). (Fonte: <https://claraealinebioifes.wordpress.com/tag/gram-positiva/>; <http://www.cenapro.com.br/noticias-detahes.asp?codigo=803>; http://users.med.up.pt/cc04-10/Microdesgravadas/14_Micobacterias.pdf)

Antes de realizar a coloração, é necessário fixar os esfregaços que pode ser pelo calor ou pelo metanol. Depois de fixar as lâminas, estas são colocadas no suporte do corador de lâminas automático, PolyStainer, que realiza os três tipos de coloração (Anexo III), dependendo do programa escolhido e cora até 20 lâminas simultaneamente.

3.4.3 Produtos

Urina

As infeções do trato urinário são das mais comuns no mundo e por conseguinte, a urina é o produto mais abundante no laboratório de microbiologia. As infeções do trato urinário podem ocorrer ao nível da bexiga e são designadas de cistite, ou podem atingir o parênquima renal e são denominadas de pielonefrite. Quer num caso, quer no outro, o microrganismo causador mais comum é a enterobactéria *Escherichia coli* e o sexo mais afetado é o feminino, maioritariamente devido à sua anatomia.

Em utentes externos, é o próprio utente que realiza a colheita para urocultura, que deve ser bem explicada para ser realizada corretamente. Realiza-se na primeira urina da manhã, após higienização da zona genital com água e sabão, sem serem usados agentes antimicrobianos, colhendo o jato intermédio para um contentor estéril fornecido pelo laboratório. Após a amostra ser entregue, efetuar o processamento em menos de duas horas, se for possível. No caso do SPC, se forem amostras de outras unidades, que necessitam ser transportadas até à unidade de Tomar, são colocadas em meio de transporte, ácido bórico, que vai conservar o número de bactérias.

Quando as amostras chegam ao laboratório é realizada a urocultura, que consiste na sementeira para quantificação de microrganismos e a análise sumária de urina, designada de urina tipo II, que inclui a visualização do sedimento ao microscópio ótico. A análise sumária de urina é realizada no equipamento Aution Max AX42-80.

Para realizar a quantificação de microrganismos, as urinas são semeadas em meio CLED,



Figura 3. Meio CLED com colónias fermentadoras da lactose. (Fonte: SPC Tomar).

seletivo constituído por cistina, lactose, indicador de pH (azul de bromotimol) e é deficiente em eletrólitos. Este meio permite diferenciar colónias fermentadoras da lactose, colónias de cor amarela (Fig. 3), das não fermentadoras, colónias verdes, azuis ou incolores. O fato de ser deficiente em eletrólitos inibe o *swarming* de *Proteus* spp [6]. Quando a urina pertence a uma utente grávida ou teve de ser colhida por punção supra-púbica semeia-se também meio Gelose de Sangue (GS), não seletivo, constituído por 5% de sangue de carneiro, que permite diferenciar colónias hemolíticas. No caso das grávidas, o meio

GS é importante para detetar o crescimento de *Streptococcus agalactiae* e na colheita por punção supra-púbica, este meio é acrescentado por uma questão de segurança pois qualquer

microrganismo que cresça desta amostra é para valorizar. Para as urinas não é realizada a coloração de Gram. No Anexo IV apresentam-se as condições de incubação, por produto.

Hemoculturas

Nas hemoculturas, a colheita adquire importância quanto ao volume necessário, devido à baixa concentração de microrganismos. Os volumes recomendados são 10 a 30 ml para adultos e 1 a 5 ml para crianças [6]. Nas crianças o volume sanguíneo necessário é menor, pois têm menor superfície corporal, menor aporte de sangue e a concentração de microrganismos é, por norma, superior. Geralmente nos adultos são colhidas três amostras, por punção venosa, em veias periféricas diferentes [6]. A amostra é inoculada em garrafas de hemocultura específicas que contêm um meio enriquecido com caldo de soja e caseína. Existem garrafas para cultura de microrganismos aeróbios, em que meio contém O₂ e para anaeróbios, em que o meio contém CO₂.

Por norma, as hemoculturas que chegam ao laboratório são provenientes das outras unidades e são hemoculturas já positivas. Quando são hemoculturas da própria unidade, são

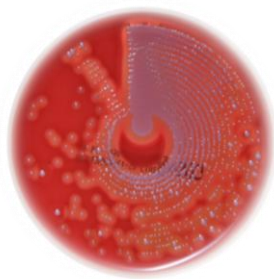


Figura 4. Meio GS com colónias de *S. aureus* e *S. pyogenes*. (Fonte: <http://www.biomerieux-culturemedia.com>)

recebidas e colocadas no aparelho de incubação Bactec 9120 que promove a agitação das garrafas, com 30 ciclos de agitação por minuto e deteta a produção de CO₂ através de um sensor, alertando para a positividade da cultura.

Sempre que são recebidas garrafas de hemocultura já dadas como positivas, é feita uma sementeira em meio GS por ser não seletivo e permitir a deteção da hemólise, por conter hemoglobina (Fig. 4). Para além da sementeira é realizada uma coloração de Gram que vai indicar a presença de cocos e/ou bacilos positivos ou negativos.

Medula Óssea e LCR

A meningite é uma patologia do sistema nervoso central, caracteriza-se por uma inflamação das meninges e pode ser causada por diversos microrganismos. Nas crianças, o patógeno mais comum é *Neisseria meningitidis* e nos adultos *Streptococcus pneumoniae*. No laboratório, a medula óssea e o LCR são processados com a máxima prioridade pois são obtidos por colheitas invasivas e geralmente em pouca quantidade. De modo a concentrar o produto, o LCR é centrifugado durante 10 minutos a 1500 rpm antes de ser processado. Após centrifugação, é decantado, guardado o sobrenadante e apenas o sedimento é semeado. Para os dois produtos é realizada uma coloração de Gram e são feitas duas sementeiras para isolamento, uma em meio GS, que evidencia a hemólise, e outra em PVX,

para microrganismos fastidiosos como *Neisseria meningitidis*. Os produtos são também inoculados no caldo de enriquecimento Brain-Heart Infusion (BHI) para promover o crescimento bacteriano, que pode não ser evidente no produto original. O BHI inoculado com o produto é semeado em GS, passado 24 horas.

Ponta de Cateter

O cateter é semeado pela técnica de Maki em gelose de sangue. Esta técnica consiste em colocar a ponta de cateter na superfície da placa e com a ajuda de uma pinça estéril ou uma ansa, rolar o cateter por toda a superfície do meio, pelo menos duas vezes com vista à obtenção de colónias isoladas [4].

Líquidos de Serosas

Nesta categoria de produtos, estão incluídos o líquido pleural, pericárdico, sinovial e peritoneal (ascítico). São líquidos orgânicos, estéreis e têm de ser centrifugados durante 20 minutos a 1500 rpm, antes de serem semeados, para alcançar uma maior concentração dos possíveis microrganismos presentes. Após centrifugação, o sedimento é semeado em GS, PVX e BHI e é realizada a coloração de Gram.

Exsudados/ Coleções Purulentas

Este tipo de produto engloba diferentes processamentos, dependendo da origem. Normalmente, os exsudados e coleções purulentas são colhidos em zaragatoa e colocados em meio de transporte Amies [6].

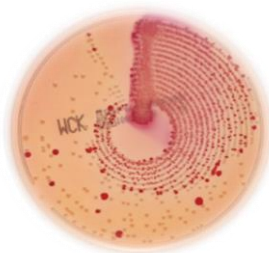


Figura 5. Meio MacConkey com colónias de *E. coli* (rosa)
(Fonte:<http://www.biomerieux-culturemedia.com>)

Quando se trata de um exsudado de uma ferida (pus), é semeado em meio GS, MacConkey (MAC) e BHI e é feita uma coloração de Gram. O meio MAC é seletivo para bactérias Gram negativo devido aos sais biliares e ao cristal violeta que inibem o crescimento de bactérias Gram positivo e diferencia bactérias fermentadoras da lactose que formam colónias rosa a vermelho (Fig. 5), das não fermentadoras que formam colónias incolores a bege. O meio GS permite a deteção de *Staphylococcus* spp e/ou *Streptococcus* spp através da hemólise.

Se se tratar de um exsudado ocular ou auricular são semeados os meios HAE, GS e BHI e é realizado também a coloração de Gram. O meio HAE é seletivo e indicado para isolamento de espécies de *Haemophilus* spp devido à combinação de antibióticos que o constituem, para além da base nutritiva com fatores X e V, fornecidos pela hemoglobina. *H. influenza* é um dos agentes etiológicos mais comuns das otites em crianças, com mais de três

meses de idade, e *H. influenza*, biogrupo *aegyptos*, é um dos causadores de infecções oculares como conjuntivites, também em crianças.

No caso de um exsudado faríngeo, apenas são semeados os meios GS e BHI, mantendo-se a realização da coloração de Gram. Apesar do agente etiológico viral ser o mais comum em casos de faringite, *S. pyogenes* lidera a lista de agentes bacterianos que causam este tipo de infecção, sendo por isso imprescindível a utilização do meio GS para detetar a β -hemólise, característica dos *Streptococcus* do grupo A.

Na presença de um exsudado nasal ou de um exsudado perineal não é feita a coloração de Gram e apenas é semeado o meio ChromID MRSA, por sementeira de toalha. Este meio é utilizado para fazer o *screening* de portadores de *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA), um dos patogéneos nosocomiais de maior importância [7]. Quando o *screening* é positivo, o paciente em causa tem de ser isolado, para evitar a dispersão deste patogéneo. O meio ChromID MRSA permite identificação presuntiva de MRSA, com base na coloração rosa das colónias.

O mesmo procedimento é realizado para um exsudado vaginal/retal, utilizando, neste caso, o meio ChromID *Strepto B* que permite a identificação presuntiva de *Streptococcus agalactiae* (Grupo B) com base na formação de colónias cor-de-rosa a vermelho, redondas e em forma de pérola após 18-24 horas de incubação. Este *screening* de *Streptococcus agalactiae* é de extrema importância nas mulheres grávidas pois se estiver presente pode originar complicações no bebé ao ser transmitido no momento do parto.



Figura 6. Meio CAN com colónias de *Candida albicans* (azuis) (Fonte: <http://www.biomerieux-culturemedia.com>)

Por último, os exsudados vaginais, são semeados em GS, VCAT e gelose ChromID Candida (CAN), é feita a coloração de Gram e o esfregaço a fresco. O meio VCAT é seletivo, constituído por uma base nutritiva com fatores X e V, PolyVitex e combinação de antibióticos (vancomicina, colistina, anfotericina e trimetoprim), permitindo o isolamento de diferentes espécies de *Neisseria* spp, sendo imprescindível para o isolamento de *Neisseria gonorrhoeae*, um importante agente etiológico de doenças sexualmente transmissíveis.

O meio CAN é cromogénico e permite o isolamento de fungos leveduriformes e identificação de *Candida albicans* com base na formação de colónias azuis devida à hidrólise de hexosaminidase (Fig. 6) [4]. *C. albicans* é uma levedura que faz parte da flora normal, mas quando a flora bacteriana está diminuída, por exemplo com a toma de antibióticos, adquire virulência.

Biópsias e Material de Próteses

Para este tipo de produtos, caso a consistência do produto o permita, é semeado o meio GS e colocado o resto do produto em meio BHI. No caso do produto ser rígido e não permitir a sementeira, deve ser feito o esmagamento e colocar em meio BHI com o intuito de facilitar o crescimento de microrganismos que possam estar no interior. O BHI, após incubação de 24h, é repicado para GS.

Secreções Respiratórias

A amostra mais comum é a expetoração, que deve ser colhida de manhã através de uma tosse profunda e não deve conter saliva.

Streptococcus pneumoniae, *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae* são três dos microrganismos com mais importância clínica neste tipo de amostras e são por isso usados os meios GS e HAE e é realizada a coloração de Gram. O meio GS permite observar α -hemólise no caso de *S. pneumoniae* e β -hemólise no caso de *S. aureus* e o HAE é seletivo e permite isolar espécies de *Haemophilus* spp. O esfregaço para coloração de Gram, neste caso, é utilizado para avaliar a qualidade da amostra, de acordo com a tabela de Murray e Washington (Anexo V).

Se for pedido pelo médico a pesquisa de fungos, este tipo de produtos é também semeado em meio Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol (SCG). É um meio seletivo que permite o isolamento de leveduras e fungos filamentosos, favorecidos pelo meio ácido e peptonas de dextrose e inibe o crescimento bacteriano com a presença de cloranfenicol e gentamicina.

Fezes

Apesar das defesas do organismo contra a infecção gastrointestinal, esta pode acontecer e ser causada por diversos microrganismos. No laboratório a pesquisa é feita no sentido de isolar espécies de *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Yersinia* spp e *Campylobacter* spp. Para pesquisa de qualquer outro microrganismo, é necessário ser feito o pedido específico por parte do médico. As enterobactérias *Salmonella* spp e *Shigella* spp causam salmonelose e disenteria bacilar, respetivamente. *Yersinia enterocolitica* produz uma síndrome semelhante ao da *Salmonella* spp e *Campylobacter jejuni*, dores abdominais e diarreia com sangue e pus.

As fezes vêm normalmente colhidas em zaragatoa, em meio de transporte Cary-Blair. Para isolamento de *Salmonella* spp e *Shigella* spp usa-se o meio Hektoen (HEK) que é seletivo e diferencial. É constituído por sais biliares, lactose, sacarose, salicina, tiosulfato de sódio e citrato férrico amoniacal e contém os indicadores de pH fucsina ácida e azul de timol. Os sais biliares tornam o meio seletivo para bactérias Gram negativo pois inibem o crescimento

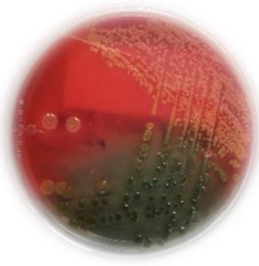


Figura 7. Meio HEK com colónias fermentadoras (rosa-amareladas) e colónias não fermentadoras (verdes) (Fonte:<http://www.biomerieux-culturemedia.com>)

de bactérias Gram positivo. Colónias fermentadoras de um dos três açúcares presentes no meio, formam colónias amarelas ou rosa-amareladas e as colónias não fermentadoras são verdes, verdes-azuladas ou incolores (Fig. 7). O tiosulfato de sódio e o citrato de ferro amoniacal permitem diferenciar colónias produtoras de H_2S , que formam um centro negro. É usado também o selenito, um meio de enriquecimento para *Salmonella* spp e *Shigella* spp, inibindo a maioria das restantes enterobactérias [6]. A repicagem para meio HEK deve ocorrer entre as 6 e 12 horas, prazo médio de inibição de outras estirpes, tal como o *Proteus* spp [6]. O meio YER é usado para o isolamento de *Yersinia* spp e a gelose Campyloset (CAMPY) permite o isolamento de

espécies de *Campylobacter* spp e contém agentes antibióticos e antifúngicos que inibem os contaminantes bacterianos e fúngicos. O meio CAMPY é incubado utilizando o GENbag, que consiste num envelope de plástico onde é colocado o gerador de atmosfera e a placa do meio de cultura e que é depois fechado hermeticamente. A concentração de O_2 conseguida no GENbag varia entre os 5,5% e os 12% após 24 horas. É utilizada a temperatura de $42^\circ C$ pois esta inibe o crescimento das outras espécies da flora normal do cólon, enquanto que as espécies de *Campylobacter* spp não são afetadas [8]. Para além dos meios referidos, também é semeado o meio MAC e se forem observadas colónias compatíveis com *E. coli*, pode ser pedida a serologia para pesquisa do antigénio O_{157} da *E. coli* enterohemorrágica, serótipo que provoca colite hemorrágica.

No caso das fezes, não é feita a coloração de Gram pois a flora normal é abundante e não fornece informação útil.

Frequentemente, é pedida a pesquisa de sangue oculto nas fezes, considerado um passo importante para o rastreio de patologias do sistema gastrointestinal inferior, como por exemplo cancro cólon-retal. Esta pesquisa é realizada com um teste rápido imunocromatográfico ChemTrue[®] One Step FOB, que deteta a hemoglobina nas fezes humanas. O dispositivo de teste contém uma tira de membrana, revestida com anticorpo anti-hemoglobina humana na região da linha de teste (T) e anticorpo de cabra anti-rato na região da linha de controlo (C) (Fig. 8). Para este pedido, são enviadas três amostras que devem ser colhidas num período de 7 a 10 dias [9].

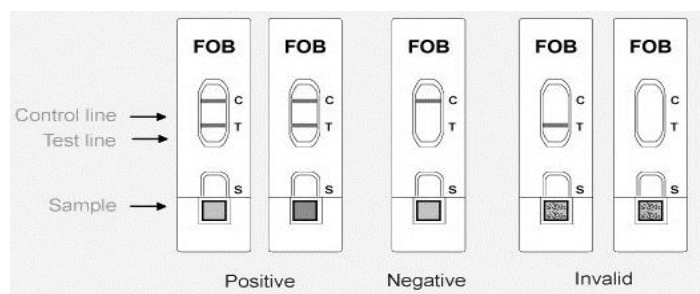


Figura 8. Ilustração dos vários resultados possíveis do teste para pesquisa de sangue oculto. (Fonte: <http://www.inter-chemical.com/products.asp?ID=39>)

Surgem também pedidos para pesquisa de *Clostridium difficile* GDH (Glutamato Desidrogenase) e das Toxinas A e B. *C. difficile* é um bacilo Gram positivo, principal causador de colites, nomeadamente a colite-pseudomembranosa [10]. As infeções causadas por este microrganismo têm vindo a aumentar em número e severidade. Toxina A (enterotoxina) e toxina B (citotoxina) são fatores de virulência da espécie. Glutamato desidrogenase é um antígeno da parede celular desta espécie e é um marcador sensível para a deteção de *C. difficile*, com aproximadamente 100% sensibilidade [10].

No laboratório, a pesquisa de GDH e das Toxinas A e B, é feita por testes imunocromatográficos RIDA[®] QUICK *Clostridium difficile* GDH e RIDA[®] QUICK *Clostridium difficile* Toxin A/B), respetivamente, que fornecem resultados fiáveis em cerca de 15 minutos. O primeiro teste funciona como *screening* e apenas nas amostras positivas, são pesquisadas as toxinas.

3.4.4 Outros Meios

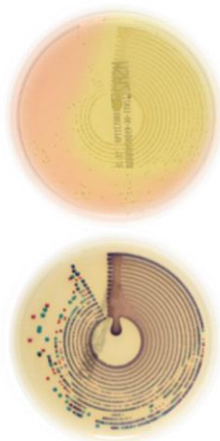


Figura 9. Meio MSA (em cima) e meio CARBA (em baixo) (Fonte: <http://www.biomerieux-culturemedia.com>).

Para além dos meios referidos e descritos anteriormente, o laboratório possui ainda os meios MSA, o CNA e CARBA. O meio Manitol Salgado (MSA) é seletivo e diferencial pois é rico em manitol e cloreto de sódio, favorecendo o crescimento de *Staphylococcus* spp e limita o crescimento de outras bactérias. Possibilita ainda a identificação presuntiva de *S. aureus* através de colónias amarelas devido à fermentação do manitol (Fig. 9). O meio CNA é seletivo para bactérias Gram positivo pois o ácido nalidíxico e a colistina inibem a maioria das bactérias Gram negativo. O meio CARBA é um meio cromogénico que permite a deteção de enterobactérias produtoras de carbapenemases (Fig. 9).

3.4.5 Provas de Identificação Bacteriana

Teste de Sensibilidade à Optoquina

A optoquina é uma substância facilmente difundível em meio sólido e é usada para identificação presuntiva de *Streptococcus pneumoniae* [11] uma vez que esta espécie é sensível à optoquina, observando-se um halo de inibição na cultura em placa. Outros *Streptococcus* spp α -hemolíticos são resistentes à optoquina, não se observando o halo de inibição, permitindo assim diferenciar esses *Streptococcus* spp de *Streptococcus pneumoniae*. Para realizar este teste, faz-se a sementeira de uma suspensão bacteriana, com turvação 0,5 McFarland, em meio GS e coloca-se um disco de optoquina por cima. Após incubação a 35°C com aproximadamente 5% de CO₂, durante 18 a 24 horas, observa-se se existe o halo. Se o halo for <14mm, indica que a estirpe é resistente à optoquina e presume-se que não se trata de *S. pneumoniae*. Se o halo for \geq a 14mm, indica que a estirpe é sensível à optoquina e faz-se a identificação presuntiva de *S. pneumoniae*.

Teste da Catalase

Esta prova é útil para diferenciar *Staphylococcus* spp de *Streptococcus* spp pois os primeiros são catalase positiva e os segundos são catalase negativa.

Com a ansa ou com a ponta de uma pipeta de Pasteur, transfere-se a colônia em estudo para uma lâmina de vidro e adiciona-se uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%. Observa-se imediatamente se existe ou não formação de bolhas de ar, a formação dessas bolhas traduz-se numa reação positiva. Esta prova pode ser também realizada colocando em primeiro lugar a gota de peróxido de hidrogênio e só depois a colônia em estudo [6]. A catalase desdobra o peróxido de hidrogênio (3%) em água e oxigênio [6].

É necessário ter atenção que culturas com mais de 24h podem dar falsos negativos e que quando a prova é realizada a partir de colônias retiradas de meios contendo sangue, podem surgir falsos positivos, devido à existência de catalase nos eritrócitos [6].

Teste da Citocromo-oxidase

As citocromo-oxidases são hemoproteínas que atuam como aceitador final na cadeia respiratória transferindo elétrons (hidrogênio) para o oxigênio, com formação de água. O teste utiliza um corante que substitui o oxigênio como aceitador de hidrogênio, permitindo o aparecimento de cor [6].

Utilizam-se *slides* comerciais (BBL™ DrySlide™ Oxidase) com papel de filtro impregnado de reagente tetrametil-p- fenilenediamina dihidroclorato e com ácido ascórbico como agente redutor e estabilizador. Com uma ansa (não metálica) retira-se uma colónia a testar que é colocada sobre o papel. As colónias com bactérias que possuam a enzima desenvolvem uma cor azul-roxo escura em mais ou menos 10 segundos [6]. Este teste permite diferenciar, por exemplo, colónias de *Pseudomonas* spp de outras lactose negativa.

Teste da Coagulase

O teste da coagulase permite fazer uma identificação presuntiva de *Staphylococcus aureus* pois esta é a única espécie humana coagulase positiva.

Num tubo com 0,5 ml de plasma de coelho, previamente hidratado com água destilada, inocular uma colónia isolada da cultura em estudo e incubar a 35-37°C. A primeira leitura é feita ao fim de 4h de incubação e sem agitar o tubo, se existir formação de coágulo é considerada reação positiva. Se não existir coágulo às 4h, voltar a incubar e fazer a leitura às 24h [6].

A coagulase livre (libertada pelas células) atua na protrombina originando uma substância semelhante à trombina, que atua no fibrinogénio formando um coágulo de fibrina [6].

Teste da Urease

Com este teste é possível distinguir *Proteus* spp. de *Salmonella* spp, se estes apresentarem colónias semelhantes em meio Hektoen. O primeiro possui a enzima urease e resulta num teste positivo, por aumento do pH, onde se observa uma cor rosa avermelhada do meio ureia-indol. Já *Salmonella* spp é urease negativa, ou seja, o meio permanece na sua cor original, amarelo.

3.4.6 Micobacteriologia

Diariamente são inoculadas as amostras que tem pedido de pesquisa de micobactérias. Por conveniência os pedidos vêm descritos como BK (Bacilo de Koch) apesar da pesquisa não ser restrita ao *Mycobacterium tuberculosis*. Estas amostras são processadas numa sala específica, com uma câmara de fluxo de nível III e onde se encontra o equipamento Bactec 9000 MB necessário à incubação destas amostras.

Diferentes amostras são recebidas com pedido de pesquisa de BK. Antes da inoculação, amostras provenientes do aparelho respiratório, como expetorações ou secreções, são liquefeitas e descontaminadas com BBL™ MycoPrep™ Reagent, que é constituído por NaOH a 2% combinado com N-acetil-L-cisteína, ambos agentes mucolíticos [<https://www.bd.com/ds/technicalCenter/dsi/dsi-MYCOPREP.pdf>] durante 15 minutos e centrifugadas também durante 15 minutos a 3000 rpm. Amostras líquidas não estéreis, são descontaminadas e centrifugadas e amostras estéreis como LCR são apenas centrifugadas (quando a quantidade é muito pequena, não se centrifuga e inocula-se todo o produto).

Após o processo de preparação das amostras, estas são inoculadas nos BD Frascos de Cultura BACTEC™ MYCO/F-Sputa que contêm meio líquido de Middlebrook 7H9 com CO₂ ao qual é adicionado o Suplemento/F BACTEC, para potenciar o crescimento dos BAAR. Para amostras do aparelho respiratório e amostras não estéreis é também adicionado o Suplemento de Antibióticos PANTA/F BACTEC a fim de eliminar outras bactérias presentes. Para amostras corporais estéreis, é apenas adicionado o Suplemento/F BACTEC. Para além da inoculação nos frascos de cultura, é feito um esfregaço que é fixado pelo calor e corado por auramina.

A incubação é feita no BACTEC 9000MB, equipamento este que possui um leitor de código de barras próprio e, ao introduzir o frasco de cultura, são lidos os códigos da garrafa e da etiqueta do pedido, ficando assim associados. Quando são lidos os códigos, é atribuída uma posição ao frasco pelo próprio equipamento. Os frascos ficam submetidos a uma incubação contínua a 37°C, com agitação a cada dez minutos para obter um crescimento ótimo. Se crescerem microrganismos, a sua respiração provoca uma diminuição detetável do oxigénio desse frasco, levando a um aumento na fluorescência do sensor do frasco. A monitorização da fluorescência é feita a cada dez minutos pelo sistema 9000 MB BACTEC e a análise da velocidade de diminuição do oxigénio dissolvido é utilizada para determinar se a cultura do frasco é positiva, ou seja, se existem microrganismos.

Quando o equipamento dá um frasco como positivo, é feito um esfregaço que é fixado com metanol e corado pela coloração de Ziehl Neelsen modificado para diferenciar entre uma contaminação, em que cocos e bacilos coram de azul, e a presença efetiva de BAAR que coram de vermelho, devido ao ácido micólico da parede. Se forem observados os bacilos ácido-álcool resistentes, o frasco de cultura é enviado para o INSA para ser feita a identificação e o antibiograma. Por outro lado, se forem observados microrganismos corados de azul, a amostra é considerada contaminada e sofre uma descontaminação e é reincubada.

Devido ao crescimento fastidioso das micobactérias, os frascos de cultura têm de estar incubados no mínimo 42 dias sem apresentarem sinais visíveis de positividade, para poderem ser dados como negativos e serem retirados do equipamento.

3.4.7 Parasitologia

Os parasitas intestinais incluem um amplo grupo de microrganismos, dos quais os protozoários e os helmintas são os mais representativos [12]. No SPC surgem pedidos para pesquisa de antígeno de *Giardia lamblia*, exame parasitológico de fezes e pesquisa de ovos de *Enterobius vermicularis*. Para estes pedidos, são enviadas três amostras que devem ser colhidas num período de 7 a 10 dias [9].

- Pesquisa de antígeno de *Giardia lamblia*

Giardia é um protozoário flagelado que infeta vários hospedeiros vertebrados, contudo a única espécie que infeta o Homem é *Giardia lamblia* (*G. duodenalis*, ou *G. intestinalis*), provocando giardíase. Pode ter uma transmissão indireta através de águas e alimentos contaminados, ou direta de pessoa para pessoa ou animal-pessoa. Pode ocorrer uma infeção assintomática ou sintomática com diarreia e esteatorreia, por exemplo [13].

A pesquisa de antígeno de *G. lamblia* é realizada com um teste rápido imunocromatográfico CORIS BioConcept, que possui uma membrana de nitrocelulose com anticorpos contra *Giardia lamblia*. Quando a tira é mergulhada na suspensão de fezes, a suspensão sobe por capilaridade e se os antígenos estiverem presentes, ligam-se aos anticorpos, formando a linha de teste. Para validar o resultado é sempre necessário que a tira de controlo seja visível (Fig. 10).

- Exame parasitológico de fezes

Este exame tem como objetivo colocar em evidência e identificar os parasitas que podem estar a causar parasitose ao utente. No laboratório é realizado com o kit *Easy Copros* da Iberkit que tem por base o método de sedimentação por centrifugação de Ritchie, simplificado. Neste kit, a amostra é colocada num tubo contendo formalina 10%, que tem

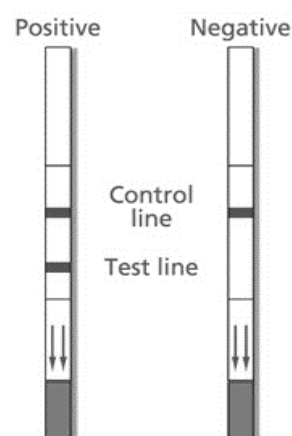


Figura 10. Ilustração dos resultados possíveis do teste para pesquisa de antígeno de *Giardia lamblia*. (Fonte: <http://www.baptistamarques.pt/apresprodutos.php?prod=6788>)

como objetivo prevenir a contaminação acidental em laboratório e é depois adicionado acetato de etilo (Fig. 11). O método usado tem como finalidade concentrar ovos e quistos de parasitas para serem mais facilmente observados e identificados ao ser realizada a observação ao microscópio do sedimento.

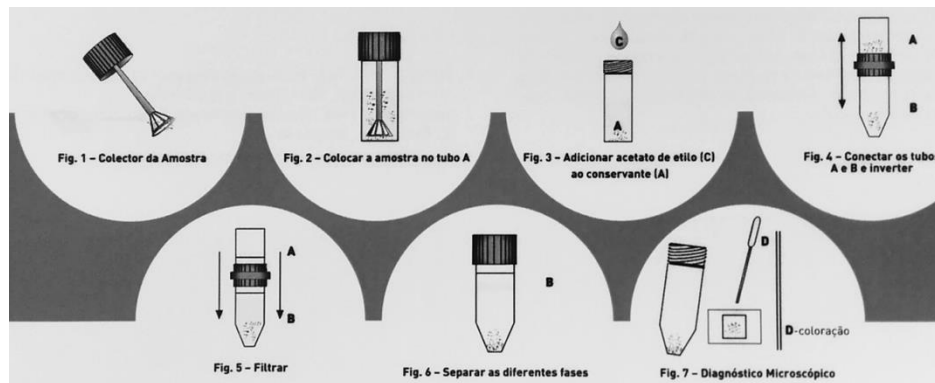


Figura 11. Ilustração da execução do exame parasitológico de fezes.

- Pesquisa de ovos de *Enterobius vermicularis*

O parasita *Enterobius vermicularis*, também chamado de oxiúros pode ser detetado ocasionalmente nas fezes, mas os seus ovos raramente lá são encontrados (5% dos casos), e portanto, não é aconselhado o exame parasitológico de fezes para o diagnóstico da infecção por este parasita. A forma mais eficaz de fazer o diagnóstico é utilizando a técnica de *Graham*, que consiste no toque da zona perianal com a parte aderente da fita-cola com a ajuda de uma espátula, de manhã e antes de qualquer manipulação, para fazer a recolha dos ovos [12]. A fita cola é posteriormente colada numa lâmina de vidro para ser visualizada ao microscópio [12].

3.4.8 Validação

São os TSS/MPC do setor de microbiologia que validam os resultados obtidos neste setor e que os inserem no sistema informático para ficarem disponíveis para os médicos. Após a incubação de 18 a 24h, os TSS observam cada um dos meios semeados e agem de acordo com o observado. Se não houver crescimento, e não se observar nada na coloração de Gram, o resultado é dado como negativo.

Quando há crescimento é necessário ter em conta a origem do produto e a quantidade de colónias diferentes presentes no meio. No caso de a amostra ser urina, existem vários critérios para validação de uma cultura de urina. Como é semeada de um modo específico e com uma ansa calibrada de 1µL, é geralmente considerada positiva se o

número de colónias for superior a 10^5 UFC/ml, que corresponde a 100 colónias [6], contudo pode ser considerada positiva se tiver menos de 10^5 UFC/ml, dependendo da forma como foi colhida, como por exemplo nas urinas colhidas por punção supra-púbica ou colhidas cirurgicamente, onde deve ser valorizado qualquer crescimento pois são urinas teoricamente estéreis. Quando crescem no meio três ou mais tipos de colónias diferentes, a amostra é considerada conspurcada e é pedida nova amostra.

Para amostras de expetoração ou secreções, é observado primeiro a coloração de Gram, com objetiva de 10x, cerca de 10 campos, para avaliar a qualidade da amostra e a presença de polimorfonucleares. As amostras são valorizadas de acordo com a tabela de Murray e Washington (Anexo V), sendo que as amostras que se inserem os grupos 4 e 5 são consideradas de boa qualidade por conterem poucas células epiteliais e muitos leucócitos. Após observação dos meios, o TSS/MPC pode fazer a identificação, num dos equipamentos disponíveis, das colónias que sejam suspeitas de pertencer a um microrganismo patogénico, em conjunto com o respetivo antibiograma, ou pode pedir uma coloração de Gram das colónias para obter mais informações e dirigir a identificação.

Em produtos estéreis como a medula óssea e o LCR, qualquer microrganismo encontrado é de valorizar visto que estes produtos não possuem flora normal. Na observação da coloração de Gram, se forem encontrados diplococos Gram negativos, é possível fazer uma identificação presuntiva de *Neisseria* spp, assim como se forem encontrados cocos Gram positivos em cadeia, é informado o clínico da compatibilidade com *Streptococcus* spp e posteriormente é feita a identificação. No caso do sangue, uma das tarefas importantes da validação é distinguir entre uma verdadeira infeção ou uma possível contaminação da pele. *Staphylococcus epidermidis* é uma bactéria comensal da pele e é responsável pela maior parte das contaminações, devido à má desinfeção da pele no momento da colheita.

Se o produto for uma ponta de cateter, a cultura é considerada positiva se tiver 15 ou mais colónias e se for acompanhado de uma hemocultura coincidente, caso contrário é considerado contaminação.

É nos exsudados que a origem é mais importante. Conhecer a origem do exsudado, a flora normal (quando existente) e a flora patogénica mais comum, fornece a capacidade de valorizar o que é importante e distinguir as más colheitas que causam contaminações. Tendo em conta todas as questões acima referidas, o TSS/MPC pede a identificação das colónias que são mais suspeitas de estar a causar a infeção. Nos exsudados que são semeados em

meios cromogénicos não é necessário fazer identificação nos equipamentos e é logo dada a informação ao clínico do resultado da cultura. Quando se trata de um exsudado vaginal, é realizado o esfregaço a fresco, para averiguar a presença de *Trichomonas vaginalis*, leveduras, células e polimorfonucleares.

No caso das fezes, a história clínica e a informação de viagens recentes por parte do utente, podem ajudar a dirigir o TSS/MPC para a valorização de um patógeno relevante. O trato gastrointestinal é rico em flora normal e nem todas as diarreias são fruto de doença infecciosa, tornando mais complicada a tarefa do TSS/MPC, pois apesar dos meios serem seletivos, há bactérias que crescem e que não estão necessariamente a causar infeção. Por norma, as colónias que crescerem no meio HEK, YER ou MAC e que sejam suspeitas de estar a causar infeção, são identificadas. A identificação de *Campylobacter* spp, é feita através do crescimento de colónias compatíveis e da observação da coloração de Gram onde as características morfológicas específicas (Fig. 12) deste microrganismo dirigem imediatamente o TSS/MPC para a identificação.

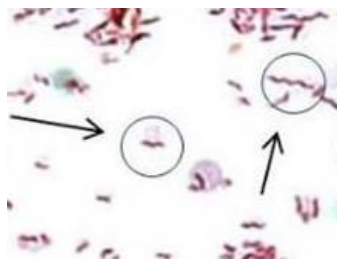


Figura 12. *Campylobacter* spp.

(Fonte: <https://lindsaymarsh.files.wordpress.com/2014/09/campylobacter1327255886464.jpg>)

Os sedimentos dos exames parasitológicos são igualmente vistos pelos TSS/MPC responsáveis pela validação, que procuram ovos, quistos ou parasitas.

3.4.9 Equipamentos

Neste setor existem dois equipamentos para realizar identificação de microrganismos e respetivo antibiograma, o Microscan Walkaway® 96 e o Vitek 2™ Compact. Apesar de servirem para o mesmo fim, estes dois equipamentos têm algumas particularidades que os tornam diferentes. Existe também um equipamento para realizar análises por Real-Time PCR e RT-PCR, o GeneXpert™.

- Vitek 2™ Compact

O equipamento Vitek 2™ Compact (Fig. 13) realiza identificação e antibiograma com cartas independentes (Tabela 4). Para a identificação (ID), usam-se cartas com 64 poços com substrato desidratado específico para o tipo de microrganismo que se pretende identificar (Gram Positivo/ Gram Negativo/ Leveduras/ Fastidiosos) e para o teste de suscetibilidade aos antibióticos (TSA) é usada uma carta também com 64 poços, com várias diluições de



Figura 13. Equipamento Vitek 2™ Compact. (Fonte: SPC de Tomar)

antibióticos específicos, tendo em conta o tipo de microrganismo (Tabela 4). Para obter o antibiograma mais indicado, este equipamento faz a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e faz a interpretação de acordo com as regras EUCAST. A CMI é validada pelo Advanced Expert System (AES), que reconhece padrões de resistência e identifica, por exemplo, as bactérias ESBL e reporta esses resultados [14].

Com este equipamento apenas se obtém bons resultados se o inóculo tiver a densidade correta (Tabela 4) e for feito com colónias frescas (48h no máximo). Demora cerca de 6 a 8 horas a realizar a identificação e faz leituras por colorimetria e turbidimetria.

Tabela 4. Cartas de Identificação e Teste de Suscetibilidade aos Antibióticos do equipamento Vitek 2™ Compact.

Carta de Identificação	Densidade	Carta de TSA	Microrganismo/ Produtos
GP	0,55-0,65 McF	TSA 619	Estafilococos
		TSA 586	Enterococos
		TSA STOI	Outros Estreptococos (β-hemolíticos e viridans)
		TSA 576	Pneumococos
GN	0,55-0,65 McF	TSA 192	Gram Negativo Urinas internas (hospital) Outros produtos
		TSA 244	Gram Negativos Urinas externas (comunidade)
		TSA 222	<i>Pseudomonas</i> spp
YST	1,80-2,20 McF	----	Leveduras
NH	2,80-3,30 McF	----	<i>Haemophilus</i> spp; <i>Campylobacter</i> spp; <i>Neisseria</i> spp

Legenda: TSA- Teste de suscetibilidade aos antibióticos; GP- Gram positivo; GN- Gram negativo; YST- yeast (leveduras); NH- *Neisseria* spp e *Haemophilus* spp; McF- McFarland.

- MicroScan WalkAway® 96

O equipamento MicroScan WalkAway® 96 (Fig. 14) utiliza painéis que realizam em simultâneo a identificação e o teste de suscetibilidade aos antibióticos (Tabela 5). A análise é realizada com colónias mais velhas, a densidade do inóculo varia de acordo com o painel utilizado e demora 6 a 8 horas a fazer a identificação e antibiograma. As leituras realizam-se por colorimetria e turbidimetria. Os painéis são compostos por 96 poços que contêm substratos para realizar a identificação através de



Figura 14. Equipamento MicroScan WalkAway® 96. (Fonte: SPC de Tomar)

provas bioquímicas e diluições de antibióticos para realizar o TSA. Assim como o Vitek 2™ Compact, este equipamento faz a determinação da CMI e faz a interpretação segundo as

regras EUCAST. A CMI é, neste caso, validada pelo sistema LabPro, que identifica, da mesma forma, padrões de resistência.

Tabela 5. Painéis de Identificação e Teste de Suscetibilidade aos Antibióticos do equipamento MicroScan WalkAway® 96.

Painel de Identificação e Teste de Suscetibilidade aos Antibióticos	Densidade	Microrganismos/ Produtos
Combo 69	0,5 McF	Gram Negativo – Urinas
Combo 70	0,5 McF	Gram Negativo – Outros produtos
Combo 71	0,5 McF	<i>Pseudomonas</i> spp
Combo 42	0,5 McF	Gram Positivo
MS Strept +6 (só TSA)	0,08 - 0,12 McF	Específico para <i>Streptococcus</i> spp
HNID (só identificação)	0,90 McF	<i>Haemophilus</i> spp, <i>Neisseria</i> spp

Legenda: TSA – Teste de suscetibilidade aos antibióticos; McF – McFarland; HNID – Identificação de *Haemophilus* spp e *Neisseria* spp.

- GeneXpert™

O equipamento GeneXpert™ (Fig. 15) realiza técnicas de Biologia Molecular para detecção do vírus da Gripe A, Gripe B, Gripe H1N1 2009, através do ensaio Xpert® Flu, e a



Figura 15. Equipamento GeneXpert™. (Fonte: SPC de Tomar).

detecção da micobactéria *Mycobacterium tuberculosis*, através do ensaio Xpert® MTB/RIF. Com este equipamento foi possível automatizar a técnica de PCR em que é feita a lise de amostras e a sua purificação, seguindo-se a amplificação dos ácidos nucleicos e a detecção da sequência alvo.

Para o ensaio Xpert® Flu são usadas amostras de lavagens ou aspirados nasais e zaragatoas nasofaríngeas e é feita a detecção e diferenciação qualitativa *in vitro* do RNA dos vírus da gripe através de multiplex real-time RT-PCR. Esta técnica que consiste na amplificação de várias sequências de DNA em simultâneo (multiplex) em tempo real, ou seja, a amplificação é detetada nas fases iniciais no ensaio e não só no fim, tornando o ensaio mais rápido. Neste caso tem de ser usada a técnica RT-PCR pois a sequência a amplificar é de RNA, havendo a

necessidade de usar a transcriptase reversa que transcreve RNA para DNA, para que este possa ser amplificado.

Para detecção da micobactéria, a amostra mais frequente é o aspirado brônquico e é feita a detecção do DNA do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Para além detecção da micobactéria, o equipamento faz a detecção de mutações do gene *rpoB*, associado a resistências à rifampicina. Neste caso é usado o nested real-time PCR, em que em primeiro lugar é amplificado uma sequência maior do que a pretendida, onde se engloba a sequência alvo e posteriormente é realizada a detecção e amplificação da sequência alvo, tornando o ensaio mais específico [15].

3.4.10 Controlo de Qualidade

No setor de microbiologia é realizado o Controlo de Qualidade Interno (CQI) com estirpes ATCC e a Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) é feita através da participação em programas externos de qualidade, que permite a comparação entre laboratórios, quer a nível nacional, quer a nível internacional. Em relação ao CQI, é realizado mensalmente e permite o controlo dos dois equipamentos de identificação e antibiograma. Todas as segundas-feiras do mês é utilizada uma estirpe diferente e é processada de acordo com o esquema seguinte da Instrução de Trabalho do SPC: Controlo de Qualidade Interno e Testes de Identificação e Suscetibilidade aos Antibióticos em Equipamento Automático. IT.SPC.045.00. 2014 (Fig. 16).



Figura 16. Esquema de trabalho do CQI [16].

A estirpe usada é devidamente identificada e os resultados dos equipamentos têm de estar em concordância com a estirpe que foi colocada em cultura. Se tal não acontecer, é necessário perceber qual o erro e fazer as correções devidas.

No que toca ao Controlo Externo da Qualidade, este setor participa nos programas UKNEQAS e PNAEQ-INSA. O primeiro é relativo à bacteriologia geral e antibiogramas e envia mensalmente produtos para serem trabalhados como se tratassem de amostras de rotina do laboratório. Os produtos são semeados e incubados e posteriormente é feita a identificação nos dois equipamentos disponíveis e enviados os resultados.

O programa PNAEQ-INSA envia amostras trimestralmente e a participação é relativa à parasitologia e micologia. É ainda efetuado o CQE para BK, duas vezes por ano e o laboratório fornecedor é o INSTAND.

Os resultados são enviados para o programa CQE correspondente e após algum tempo, o laboratório recebe um relatório com os resultados de laboratórios peritos (resultado correto), a comparação do nosso resultado com os dos outros participantes, a análise estatística e o score. No caso do resultado do SPC não estar correto, é investigado o provável erro e, se possível, são aplicadas as correções devidas.

3.5 Setor de Hematologia

Foi no setor de hematologia que terminei o meu estágio, dividindo o tempo pela componente técnica, onde trabalhei com todos os equipamentos e realizei esfregaços de sangue periférico e pela validação, onde aprendi a interpretar os valores dados pelos equipamentos e observei as lâminas dos esfregaços de sangue periférico ao microscópio. Este setor encontra-se bastante automatizado, mas não deixa de ser imprescindível o conhecimento e a prática, para que tudo decorra sem erros. É de extrema importância respeitar as condições pré-analíticas, desde a colheita com os anticoagulantes indicados, à agitação dos tubos de hemograma para evitar a sedimentação, à centrifugação dos tubos de coagulação para obtenção do plasma, para que os resultados dos equipamentos possam ser fiáveis e reproduzíveis. No Anexo VI encontra-se um resumo dos equipamentos de hematologia com o método, parâmetros e devidos valores de referência.

3.5.1 Hemograma

O hemograma proporciona a avaliação dos três componentes principais do sangue periférico (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) e portanto, é a base de qualquer avaliação hematológica [17]. Para obter resultados fiáveis, é necessário começar por uma colheita realizada da forma correta, que deve ser feita a partir a veia antecubital ou outra veia visível no antebraço, após uma correta desinfeção [18]. No SPC é usada, regra geral, a técnica do vácuo e os tubos para hemograma contém EDTA como anticoagulante, por ser um quelante de Ca^{2+} , impedindo assim a ativação da cascata da coagulação. O volume indicado para colher é de 2 ml.

O hemograma é o pedido que representa o maior volume de trabalho neste setor. É um processo automatizado, realizado no equipamento XE-2100 da Sysmex (e XT-1800i que funciona em *back up*). Este equipamento permite realizar a aspiração de forma automática ou de forma manual, caso a amostra não tenha volume suficiente, ou seja uma amostra pediátrica, que é colhida num tubo específico e com menor volume. Para além disso, é possível escolher o tipo de análise a realizar, por exemplo um hemograma simples ou um hemograma diferencial onde é feita a contagem das diferentes células brancas. Pode também ser adicionado o pedido de contagem de reticulócitos e eritroblastos.

As contagens dos diferentes tipos de células são feitas em canais distintos do equipamento para minimizar as interferências. A contagem dos leucócitos é feita por

citometria de fluxo, enquanto que a das plaquetas e dos glóbulos vermelhos é feita por impedância e o doseamento da hemoglobina (Hb) é feito pelo método SLS-Hemoglobina.

A tecnologia da impedância baseia-se no princípio da utilização de um campo elétrico criado entre dois eletrodos de carga oposta para contar células e determinar o seu tamanho. Quando as células em suspensão passam através da abertura entre os eletrodos, cada célula aumenta momentaneamente a resistência (impedância) da corrente elétrica entre os eletrodos gerando um impulso elétrico, que é proporcional ao seu tamanho [19].

O doseamento de hemoglobina, usa um agente de lise e o reagente laurilsulfato de sódio, que minimiza os interferentes em amostras com lipémia, com leucocitose ou com nível de proteínas elevadas. O canal da Hb separado do canal da contagem dos leucócitos permite o uso de um agente de lise forte, que impede que as altas contagens de leucócitos interfiram nas dosagens de Hb [<http://www.cenapro.com.br/noticias-detahes.asp?codigo=332>].

O princípio da citometria de fluxo permite a identificação e a quantificação de leucócitos através de um canal diferencial para neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos (Fig. 17), sendo medida a dispersão lateral da luz (estrutura interna da célula), dispersão frontal da luz (tamanho celular) e intensidade de fluorescência (tamanho do núcleo) [20]. Os basófilos são contabilizados num canal diferente que lisa todas as células menos os basófilos e que usa o mesmo princípio de dispersão da luz.

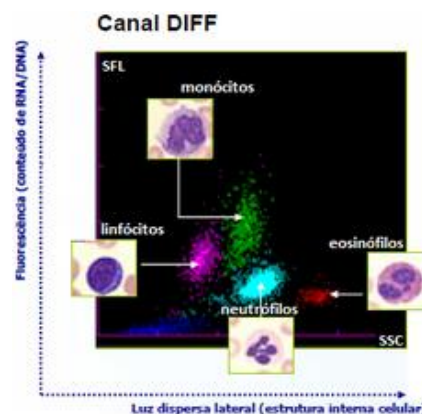


Figura 17. Gráfico do canal DIFF por citometria de fluxo fluorescente pelo equipamento XE-2100, com o posicionamento celular para uma população normal [Fonte: <http://www.cenapro.com.br/noticias-detahes.asp?codigo=332>].

Parâmetros Eritrocitários

Em conjunto, os parâmetros eritrocitários dão as informações mais adequadas para detetar a presença de uma anemia, ajudando também a classificá-la de acordo com o tamanho dos eritrócitos e/ou a quantidade de hemoglobina presente. Os eritrócitos também chamados de hemácias ou glóbulos vermelhos, são células anucleadas que compõem a maior

percentagem do sangue e são constituídos por uma membrana e um conteúdo de hemoglobina (Fig. 18).

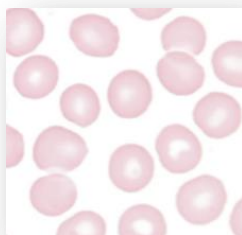


Figura 18. Eritrócitos [21].

A Hb uma hemoproteína composta por dois pares de cadeias polipeptídicas idênticas duas a duas (α e β) ligadas ao grupo heme, que por sua vez está ligado a um átomo de ferro. A principal função da hemoglobina é o transporte de oxigénio que se liga a esta proteína de forma reversível. No organismo existem várias frações de hemoglobina sendo que a maioritária é a HbA que é composta por duas cadeias α e duas cadeias β . As anomalias da hemoglobina podem ser qualitativas (estruturais) ou quantitativas (de regulação). Se forem qualitativas são chamadas de hemoglobinopatias, enquanto que se forem quantitativas, em que há diminuição da síntese de umas das cadeias, são denominadas de talassémias [22]. Outro dos parâmetros fornecido pelo equipamento é o hematócrito que representa a percentagem de eritrócitos na massa de sangue, após centrifugação. Pode ser apresentado em % ou em L/L. Na prática, o hematócrito (Ht) é calculado diretamente, multiplicando o número de eritrócitos pelo volume corpuscular médio (VCM). Como é derivado de dois resultados independentes, tem um maior risco de erro, logo assume-se que o hematócrito é uma medida de anemia menos precisa do que a concentração de hemoglobina [17].

O Volume Corpuscular Médio é dado em fentolitros e é calculado através da divisão do hematócrito pelo número de eritrócitos, fornecendo informação sobre o tamanho das células vermelhas, ajudando na classificação das anemias em normocíticas (VCM = 80-100 fl), microcíticas (VCM <80 fl) ou macrocíticas (VCM > 100 fl) [17,18].

$$VCM = \frac{\text{Hematócrito (L/L)}}{\text{Eritrócitos}(\times 10^{12}/L)}$$

A Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) também denominada de hemoglobina globular média, tem resultados em picogramas e define a hemoglobina existente em cada eritrócito, ajudando na definição de anemia hipocrómica ou normocrómica [17,18,23].

$$HCM = \frac{\text{Hemoglobina}(g/L)}{\text{Eritrócitos}(10^{12}/L)}$$

A Concentração Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) define a concentração média dos glóbulos vermelhos em hemoglobina [18,23].

$$CHCM = \frac{\text{Hemoglobina}(g/L)}{\text{Hematócrito}(L/L)}$$

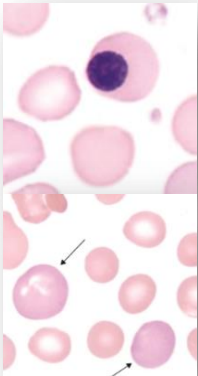


Figura 19. Eritroblastos (em cima) e Reticulócitos (em baixo) [21].

O *Red Cell Distribution Width* (RDW) é o índice de anisocitose eritrocitária, ou seja, representa a percentagem de variação dos volumes dos eritrócitos. Quando pertinente, podem também ser pedidos os NRBC (*New Red Blood Cell*) que consistem maioritariamente em eritroblastos ortocromáticos, que possuem um núcleo picnótico e um citoplasma acidófilo. Quando presentes, também são passíveis de observar num esfregaço de sangue periférico (Fig. 19). Os reticulócitos, são glóbulos vermelhos que acabaram de perder o núcleo e estão em circulação há menos de 48 horas. A taxa normal de reticulócitos é de 25 a 100 x 10¹²/L e traduz a atividade medular nas últimas 48 horas [23].

No período de estágio dedicado à hematologia, observei diversas lâminas e em alguns casos estavam presentes algumas alterações relativas à linha vermelha. Os casos mais comuns no SPC são de anemias microcíticas e hipocrômicas que têm como causa mais frequente a deficiência em ferro, que pode ser comprovada com a análise conjunta ao ferro, ferritina e saturação da transferrina. A síntese de hemoglobina pode também estar comprometida em caso de infeções crónicas e condições inflamatórias [18]. Para além desse tipo de anemias, tive oportunidade de observar um caso em que estava presente o pontuado basófilo, que consiste na presença de numerosos grânulos basófilos distribuídos por todo o eritrócito (Fig. 20) [18]. O pontuado é característico de intoxicações por metais pesados, mas é também indicativo de uma eritropoiese alterada e é observado em doenças hematológicas como anemias megaloblásticas ou talassémias [18]. A presença de células em alvo (*target cells*) apresenta também uma relativa frequência. Estas células caracterizam-se por um centro redondo e um anel periférico corados, separados por uma área descorada (Fig. 20) e estão presentes em algumas hemoglobinopatias como anemia falciforme e apresentam-se em grande número na Talassémia *major* [18].

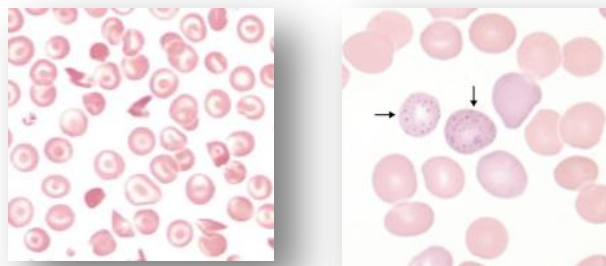


Figura 20. Target cells (à esquerda) e pontuado basófilo (à direita) [21].

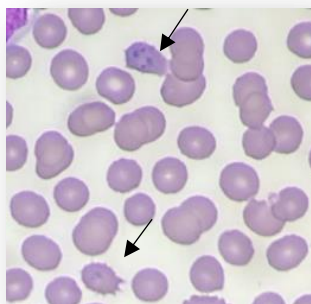


Figura 21. Eritrócitos infectados com *Plasmodium falciparum*.

(Fonte: SPC Tomar)

Um caso de infecção por *Plasmodium sp*, surgiu no último dia em que estive na validação hematológica. Uma paciente com histórico de viagens a Moçambique, foi à urgência hospitalar e ao ser pedido o ESP, foi detetada a infecção. Estavam presentes os trofozoítos de *Plasmodium falciparum* (Fig. 21). Este parasita é transmitido através da picada do mosquito fêmea do género *Anopheles* e é normalmente “importado” das áreas endémicas.

Parâmetros Leucocitários

Para além dos parâmetros eritrocitários, o contador hematológico faz igualmente a contagem das células da linha branca, com opção de contagem diferencial e de granulócitos imaturos (IG). De uma forma geral, um aumento do número de células da linha branca é denominado de leucocitose e a diminuição de leucopenia. A contagem de granulócitos imaturos inclui a contagem de metamielócitos, mielócitos e promielócitos e a contagem diferencial permite ter um resultado quantitativo de cada elemento celular da linha branca. O elemento celular mais abundante é o neutrófilo (Fig. 22A), constituído por um núcleo segmentado com 3 a 5 lóbulos, ligados por uma banda cromatina e granulações neutrófilas. O seu aumento denomina-se de neutrofilia e acontece-se em situações de infecção, normalmente bacteriana. A hipersegmentação dos neutrófilos é um aspeto importante no diagnóstico de anemias megaloblásticas [18].

Os eosinófilos (Fig. 22B) são constituídos por um núcleo segmentado, normalmente com 2 lóbulos e por granulações eosinófilas que se caracterizam pela cor laranja e a sua desgranulação está associada à libertação de histamina nas reações alérgicas. Para além da

resposta alérgica, o aumento dos eosinófilos, denominado de eosinofilia, está também associado à infecção por parasitas.

Os basófilos (Fig. 22C) são constituídos por núcleos com 3 lóbulos e por granulações basófilas, mais abundantes que as dos neutrófilos e eosinófilos e de cor negra.

Os monócitos (Fig. 22D) são a maiores células da linha branca. O núcleo pode ser oval ou reniforme e têm um citoplasma cinzento-azulado e abundante com ou sem vacúolos e com granulações finas. Nos tecidos diferenciam-se em macrófagos.

Os linfócitos (Fig. 22E) são células pequenas, com núcleo oval com cromatina densa e um citoplasma pouco abundante e azul-claro. Tanto os monócitos como os linfócitos podem ser encontrados num esfregaço de sangue periférico num estado ativado, onde os monócitos ficam vacuolados e com pseudópodes e os linfócitos ficam maiores e com uma diferente relação núcleo citoplasma (Fig. 23). Esta ativação é por norma, sinal de infecção viral e uma das situações mais frequente é a Mononucleose Infeciosa.

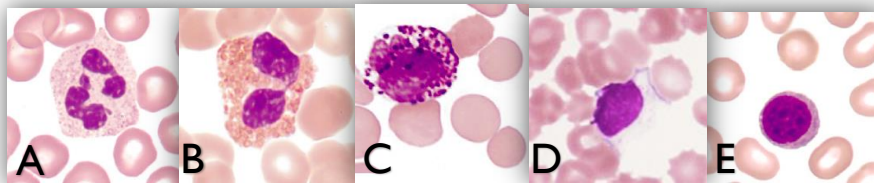


Figura 22. Células da linha branca. A-Neutrófilo; B-Eosinófilo; C-Basófilo; D-Monócito; E-Linfócito [18, 21].

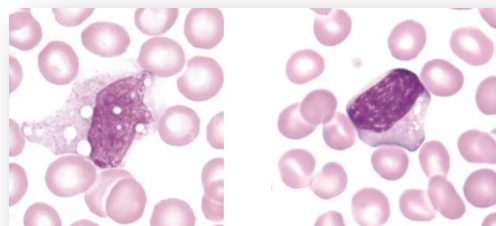


Figura 23. Monócito (à esquerda) e linfócito (à direita) ativados [21].

Outra das situações mais comuns é a Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) em que há um incremento significativo do número de linfócitos, que não aumentam de tamanho.

Parâmetros Plaquetares

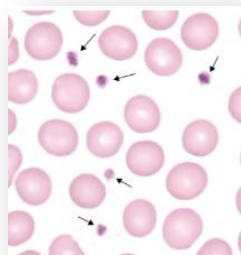


Figura 24. Plaquetas [21]

Os parâmetros plaquetares realizados pelo equipamento compreendem o número de plaquetas, o volume plaquetar médio (VPM), a distribuição em termos de tamanho (PDW) e o plaquetócrito que consiste na percentagem de plaquetas na massa de sangue total. As plaquetas são fragmentos dos megacariócitos (Fig. 24) e têm o papel principal na formação de coágulos, daí a importância da sua contagem. Neste parâmetro ocorrem com alguma frequência contagens falsamente baixas, devido à coagulação parcial da amostra, à agregação ou ao satelitismo plaquetar. O VPM tende a ser alto em pacientes com trombocitopenia, devido a processos de destruição periférica, e baixo em pacientes com supressão medular. O PDW é o índice de anisocitose plaquetar e pode indicar a presença de plaquetas gigantes (maiores que os eritrócitos). Contagem altas, por norma até 1000×10^9 , podem indicar processos inflamatórios agudos ou situações pós-hemorragicas. Valores superiores, indicam geralmente distúrbios mieloproliferativos [18].

Esfregaço de Sangue Periférico

O esfregaço de sangue periférico (ESP) é pedido pelo TSS/MPC quando há parâmetros do hemograma que levantam dúvidas, tais como o número de plaquetas abaixo dos valores de referência. O ESP é realizado como demonstrado na Fig. 25, é devidamente identificado com o nº de registo do doente e com a data. Depois de seco, é colocado no equipamento RAL Stainer, onde é realizada a coloração de May Grünwald-Giemsa que usa etanol para fixação do esfregaço.

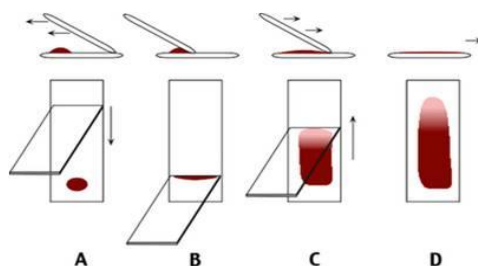


Figura 25. Ilustração da realização de um esfregaço de sangue periférico. (Fonte: <http://hemocitologia.blogspot.pt/2010/08/esfregaco-do-sangue-periferico.html>)

Depois de corado, o ESP é observado ao microscópio, primeiramente com a objetiva de 20x para ter uma visão geral do esfregaço e depois com a objetiva de imersão de 50x. Quando é necessário obter mais pormenores celulares, é usada a objetiva de imersão de 100x. O ESP deve ser observado na zona menos densa, onde as células estão mais bem

distribuídas e não se sobrepõem. Para verificar a presença de agregados plaquetares, deve sempre observar-se o bordo do esfregaço.

3.5.2 Velocidade de Sedimentação

A velocidade de sedimentação (VS) é pedida frequentemente pelos médicos e é realizada de modo automático, nos mesmos tubos em que é feito o hemograma, exceto para amostras pediátricas. O equipamento que faz a determinação da VS é o Test I BCL da ALI FAX[®]. Em primeiro lugar, este equipamento faz uma homogeneização das amostras e posteriormente envia resultados em 20 segundos por amostra, utilizando o princípio de fotometria capilar de fluxo (análise cinética).

Quando é necessário realizar esta determinação de forma manual, é seguido o método de referência de Westergren, usando uma pipeta graduada (de 0 a 170 mm), colocada na vertical. Após uma hora, é medida a distância percorrida pelos eritrócitos até haver sedimentação, dando o resultado em mm/hora.

A velocidade de sedimentação elucida sobre a fluidez sanguínea e está dependente não só de fatores plasmáticos, como também eritrocitários. O tamanho e a quantidade de eritrócitos têm uma influência direta na velocidade de sedimentação, que vai estar aumentada em caso de anemia normocítica, mas diminuída em caso de anemia microcítica [23].

3.5.3 Hemostase

A hemostase é conseguida por um conjunto de mecanismos que têm diversas funções como por exemplo, manter o sangue num estado fluído enquanto circula no sistema vascular ou parar uma hemorragia através da formação de um coágulo com a posterior dissolução desse coágulo [18]. As plaquetas são as células chave do processo hemostático, elas têm a capacidade de adesão, ativação com alteração da forma e agregação [18]. A cascata da coagulação (Fig. 26) resume o processo de formação do coágulo. É constituída pela via intrínseca e pela via extrínseca, com ativação consecutiva de fatores, que convergem numa via final comum, onde há produção de trombina que age sobre o fibrinogénio, transformando-o em fibrina que forma o coágulo [18].

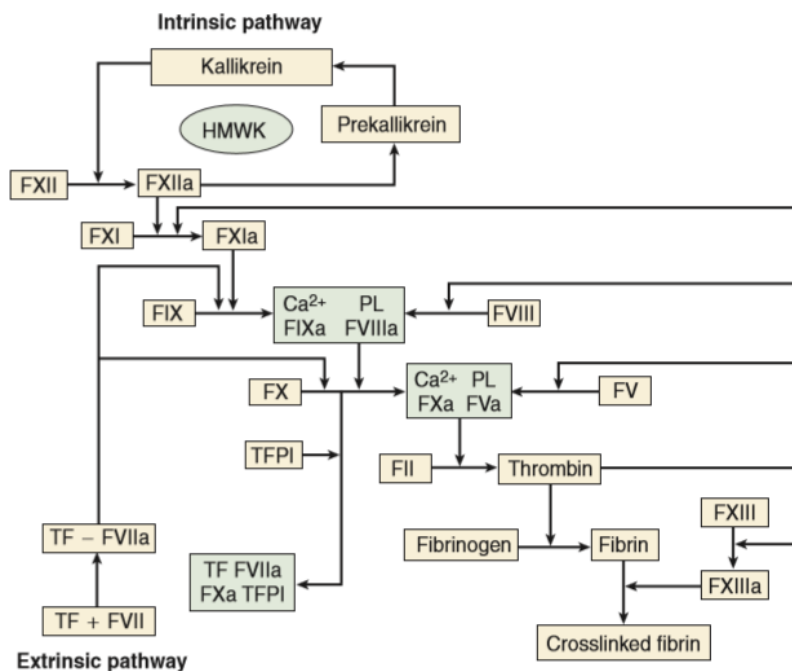


Figura 26. Cascata da coagulação [18].

Para além da formação do coágulo, a dissolução do mesmo é também um mecanismo fundamental, de modo a serem evitados eventos trombóticos. A fim de perceber se o organismo está a responder corretamente às duas situações, são realizadas as análises aos fatores coagulantes e aos fatores anticoagulantes. O tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativado (aPTT) fazem parte das análises de rotina do SPC, assim como o fibrinogénio e os D-dímeros, ou seja, diariamente o equipamento que realiza estas análises, STA[®] Compact da STAGO, é controlado para estes parâmetros. O segundo equipamento STA[®] Compact, está destinado à coagulação especial, que não é realizada todos os dias, sendo colocados os controlos apenas no momento em que são feitas as análises. O estudo da coagulação especial inclui o Tempo de Trombina (TT), doseamento da Antitrombina III, do fator VIII, do fator vonWillebrand (FvW), das Proteínas S livre e C funcional e do Anticoagulante Lúpico (AL). A colheita para o estudo da coagulação é feita para tubos com citrato trisódico, um anticoagulante que vai impedir a ativação da cascata da coagulação. As amostras são centrifugadas durante 10 minutos, para se obter o plasma pobre em plaquetas ($0-5 \times 10^9/L$) e com os fatores necessários para as análises.

No que respeita à coagulação de rotina, o TP mede o tempo de coagulação na presença de uma concentração ótima de tromboplastina. No equipamento do SPC, é usada tromboplastina de cérebro de coelho, que ativa a cascata da coagulação. O TP é o exame utilizado para monitoração da terapêutica com anticoagulantes antagonistas da vitamina K,

como a varfarina [17] e avalia a eficiência global da via extrínseca. A fim de uniformizar os resultados, devido ao uso de diferentes tromboplastinas, utiliza-se mundialmente a Razão Normalizada Internacional (INR). Para o cálculo do INR, é usado o Índice de Sensibilidade Internacional (ISI) como referência, determinado pela comparação de cada reagente com a tromboplastina padrão (OMS):

$$INR = \frac{TP (doente)^{ISI}}{TP (controlo)}$$

○ Tempo de Protrombina pode estar elevado, por exemplo, devido ao uso de anticoagulantes orais, deficiência em vitamina K ou coagulação intravascular disseminada [18].

○ aPTT avalia globalmente a via intrínseca e para isso é realizado sem adição de tromboplastina. O equipamento faz a pré-incubação do plasma com um ativador, neste caso o caulino, para iniciar a cascata da coagulação e posteriormente adiciona cálcio para a cascata poder progredir e ser medido o tempo de formação do coágulo. O aPTT vai estar aumentado na presença de heparina, na coagulação intravascular disseminada ou em caso de hepatopatia [18]. Na presença de Anticoagulante Lúpico, também vai surgir um aPTT elevado.

○ fibrinogénio é uma proteína, sintetizada pelo fígado, que se transforma em fibrina quando está sob ação da trombina, para a formação do coágulo e encontra-se elevado em todas as inflamações. O método de Clauss é o método direto cronométrico mais utilizado. Neste método, mede-se o tempo de coagulação do plasma na presença de um excesso de trombina, para que o tempo de coagulação dependa apenas da concentração do fibrinogénio e assim avaliar a via final comum [23].

Os D-Dímeros são formados a partir da degradação da fibrina pela plasmina no sistema fibrinolítico da coagulação. Quando presentes, indicam a formação de um trombo, onde foi produzida plasmina, que clivou as pontes de fibrina. A deteção dos D-Dímeros é feita por imunoturbidimetria, utilizando micropartículas de látex revestidas com anticorpos de rato anti D-Dímeros humanos. É um teste utilizado no diagnóstico da coagulação intravascular disseminada e em conjunto com a clínica pode fazer o diagnóstico do tromboembolismo pulmonar.

No que concerne à coagulação especial, o Tempo de Trombina é um dos testes de primeira linha e é calculado adicionando-se trombina exógena purificada ao plasma do paciente para avaliar o tempo de formação do coágulo. Serve para definir se o fibrinogénio

está funcionalmente normal e reflete, em última análise, a quantidade de fibrinogênio em circulação. Por ser dependente da quantidade de fibrinogênio, o TT vai estar aumentado em casos de hiperfibrinogenemia [18].

O fator VIII e o FvW funcionam em complexo. O FvW é responsável por se ligar ao fator VIII, impedindo que este seja eliminado da circulação e atua também na adesão plaquetar. O FvW é secretado pelas plaquetas, células endoteliais e megacariócitos. A detecção deste fator é feita por imunoturbidimetria, utilizando partículas de látex com anticorpos de coelho anti FvW humanos. A deficiência no FvW está relacionada com a doença de von Willebrand em que os doentes têm histórico de hemorragias [18]. Nesta doença, os doentes vão ter também um aumento da eliminação do fator VIII, levando à sua deficiência. Este déficit do FVIII não deve ser confundido com a verdadeira carência de FVIII que está presente na Hemofilia A [18]. Os resultados do doseamento do FVIII são dados em percentagem e são obtidos por correlação com o tempo de formação de coágulo utilizando reagentes em excesso para que a formação do coágulo dependa apenas do FVIII presente na amostra.

A Antitrombina III, em conjunto com a Proteína S livre e a Proteína C funcional, são os inibidores fisiológicos da coagulação. A primeira é uma glicoproteína, sintetizada no fígado e atua sobre a trombina, neutralizando-a [23]. A Proteína S livre é também uma glicoproteína sintetizada no fígado e nas células endoteliais e é dependente de vitamina K, assim como a Proteína C. Encontra-se nos grânulos das plaquetas e a fração livre é de cerca de 40% e encontra-se ativa na corrente sanguínea [23]. A Proteína C funcional é igualmente uma glicoproteína, sintetizada pelo fígado. É lançada na corrente sanguínea na forma inativa e é ativada pela trombina ligada à trombomodulina presente na superfície do endotélio vascular. Potencializada pelo seu co-fator, a Proteína S, inativa os fatores Va e VIIIa [23]. Estes anticoagulantes fisiológicos são de igual forma detetados por imunoturbidimetria, utilizando partículas de látex revestidas com os anticorpos específicos para cada proteína. A deficiência destes inibidores fisiológicos da coagulação leva a um potencial acontecimento trombótico. Em condições associadas a déficit de vitamina K, vai ser observado uma baixa concentração da Proteína C e da Proteína S [18].

O Anticoagulante Lúpico (AL) é uma imunoglobulina pertencente à família dos anticorpos antifosfolípidos que é encontrado com alguma frequência no lúpus eritematoso [18]. A β -2-glicoproteína I e a protrombina são os principais antígenos alvo dos anticorpos antifosfolípidos [24]. O AL leva a um prolongamento dos testes de protrombina, do tempo de trombotoplastina parcial ativada e do tempo do veneno da víbora de Russel diluído

(TVVRd). Este último é determinado pelo equipamento do SPC, através do teste de *screen* e de confirmação. O princípio deste teste baseia-se na ativação do fator X, pelo veneno da víbora de Russel, que vai coagular o fibrinogénio, na presença do fator V, protrombina, fosfolípidos e cálcio. O Anticoagulante Lúpico prolonga o TVVRd pois liga-se ao fosfolípido e impede a ação do veneno da víbora de Russel [18]. Para pesquisa do AL, é necessário confirmar a pré-análítica para verificar os valores de INR do paciente. Se o paciente tiver um valor de INR superior a 1,5, a pesquisa de AL não é realizada pois o resultado não iria ser fiável. O AL pode estar associado a diferentes manifestações clínicas, como trombose arterial e venosa ou trombocitopenia. Nas mulheres, dois abortos espontâneos consecutivos são indicativos para o pedido de pesquisa do Anticoagulante Lúpico.

3.5.4 Frações da hemoglobina

No SPC são realizados os doseamentos de algumas frações da hemoglobina, tais como a hemoglobina A e as suas subfrações HbA0, HbA1a, HbA1b, HbLA1c e HbA1c, hemoglobina F (fetal) e hemoglobina A2.

A HbA0 é a maior fração da hemoglobina A e na prática é a hemoglobina não glicada. Das hemoglobinas glicadas, a HbA1c é a mais estável e a que resulta de uma reação irreversível (glicação) mais específica, entre a glicose e os grupos amina livres da hemoglobina dos eritrócitos que é antecedida por uma reação enzimática reversível (glicosilação), formando-se uma Hb A1c lábil ou HbLA1c [25]. A hemoglobina fetal é composta por duas cadeias α e duas cadeias γ e existe em maior percentagem no estado fetal, enquanto que no estado adulto existe menos de 1%. A hemoglobina A2 é composta por duas cadeias α e duas cadeias δ e representa cerca de 3,5%.

A hemoglobina glicada A1c (HbA1c) é determinada para avaliar o grau de controlo glicémico, em pessoas com *Diabetes mellitus*. É importante ter em conta que o seu valor pode ser alterado por outros fatores além da glicose (p.ex. hemoglobinopatias). A determinação da HbA1c deve ser realizada, com intervalo mínimo de 4 meses, devido à vida média dos glóbulos vermelhos (120 dias).

Os doseamentos das frações A2 e F são usados para ajudar no diagnóstico de talassémias pois quando há um défice de síntese da cadeia β , estas frações vão estar aumentadas, como no caso da β -talassémia *minor*.

O equipamento em que se realiza esta análise é o Variant™II que utiliza a tecnologia de Cromatografia Líquida de Alta Pressão por troca iónica e tem a possibilidade de usar dois

métodos: Método HbA1c e Método β -Talassemias. No primeiro doseia as frações HbA1c, HbA1a, HbA1b, HbLA1c e HbA0 e no segundo, as frações HbA, HbA2, HbF, A1 e HbC e HbS, se presentes. Utiliza sangue total, colhido em tubos de hemograma. O resultado do doseamento da fração HbA1c é dado por duas unidades de referência: NSGP (National Glycohemoglobin Standardization Program), em que o resultado é indicado em % e IFCC (International Federation of Clinical Chemistry), em que o resultado é indicado em mmol/mol [<http://www.ngsp.org/docs/IFCCstd.pdf>]. O equipamento é calibrado com os calibradores utilizados universalmente a fim de uniformizar os doseamentos da hemoglobina glicada.

3.5.5 Eletroforese da Hemoglobina

Algumas das hemoglobinas anormais têm uma carga elétrica diferente da hemoglobina normal dos adultos. Ao submeter a hemoglobina a uma migração eletroforética, é possível reconhecer o seu caráter anormal [23]. Na eletroforese da hemoglobina, para além das frações A2 e F, é também possível reconhecer, se presentes, as frações S e C, que se caracterizam por ser menos solúveis que a hemoglobina A. A hemoglobina S é a variante mais comum e resulta da troca de um aminoácido, ácido glutâmico por valina, na posição 6 da cadeia β . Esta troca faz com que esta variante perca a solubilidade e tenha tendência para polimerizar dentro dos glóbulos vermelhos, formando os drepanócitos ou também designadas células em forma de foice (Fig. 27). A presença desta variante de hemoglobina provoca a anemia falciforme que é caracterizada exatamente pela presença das células em forma de foice. Esta anemia pode acontecer de forma heterozigótica ou de forma homozigótica. Na primeira forma não há sinais clínicos e o indivíduo é portador, podendo transmitir a doença de forma autossômica recessiva. Na segunda forma, para além de ser portador, já existem sinais clínicos como anemia hemolítica moderada e episódios de oclusão de vasos, devido à tendência anormal de adesão ao endotélio vascular [18]. A hemoglobina C é a segunda variante mais comum e consiste igualmente numa troca de aminoácidos na posição 6 da cadeia β mas neste caso, o ácido glutâmico é substituído por uma lisina, o que produz uma molécula de hemoglobina com maior carga positiva, menos solubilidade e com tendência para cristalizar. Estas duas variantes podem coexistir e dar origem a uma anemia falciforme moderada.

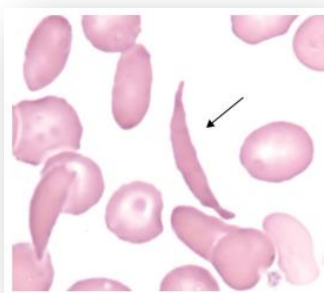
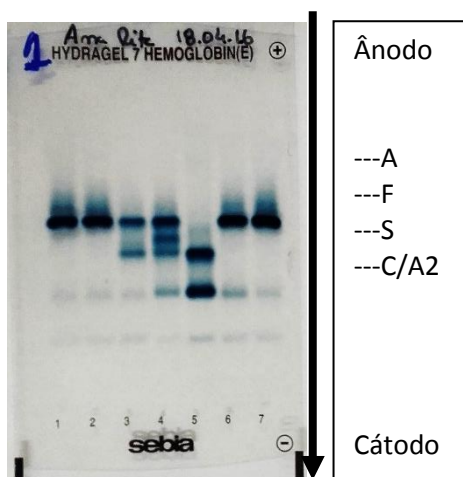


Figura 27. Drepanócitos [21].

reconhecer o seu caráter anormal [23]. Na eletroforese da hemoglobina, para além das frações A2 e F, é também possível reconhecer, se presentes, as frações S e C, que se caracterizam por ser menos solúveis que a hemoglobina A. A hemoglobina S é a variante mais comum e resulta da troca de um aminoácido, ácido glutâmico por valina, na posição 6 da cadeia β . Esta troca faz com que esta variante perca a solubilidade e tenha tendência para polimerizar dentro dos glóbulos vermelhos, formando os drepanócitos ou também designadas células em forma de foice (Fig. 27). A presença desta variante de hemoglobina provoca a anemia falciforme que é caracterizada exatamente pela presença das células em forma de foice. Esta anemia pode acontecer de forma heterozigótica ou de forma homozigótica. Na primeira forma não há sinais clínicos e o indivíduo é portador, podendo transmitir a doença de forma autossômica recessiva. Na segunda forma, para além de ser portador, já existem sinais clínicos como anemia hemolítica moderada e episódios de oclusão de vasos, devido à tendência anormal de adesão ao endotélio vascular [18]. A hemoglobina C é a segunda variante mais comum e consiste igualmente numa troca de aminoácidos na posição 6 da cadeia β mas neste caso, o ácido glutâmico é substituído por uma lisina, o que produz uma molécula de hemoglobina com maior carga positiva, menos solubilidade e com tendência para cristalizar. Estas duas variantes podem coexistir e dar origem a uma anemia falciforme moderada.

A eletroforese requer a preparação das amostras, que consiste na lavagem dos glóbulos vermelhos com soro fisiológico. A eletroforese é feita em gel de agarose, com sete posições de migração, onde são colocadas através de um pente, as amostras e os controlos. São utilizados três controlos, um para as frações A, F, S e C, outro para a fração A2 normal e outro para a fração A2 patológica. Antes da colocação no gel, os controlos liofilizados são reconstituídos com H₂O e posteriormente é adicionado um hemolisante específico, tanto às amostras como aos controlos. A eletroforese é realizada no equipamento Hydrasis Sebia que é constituído por dois elementos independentes, um onde ocorre a migração e outro onde é realizada a coloração. No primeiro elemento, estão os eléctrodos necessários e são colocadas tiras de tampão para assegurar o contato do gel com os eléctrodos, assim como o etilenoglicol na base onde se aplica o gel. Após 30 minutos de migração, é retirado o gel e coloca-se no elemento da coloração. A coloração ocorre durante 25 minutos e o corante usado é o negro de amido.



Na Fig. 28 pode observar-se um gel após migração e coloração. Na posição 2 encontra-se o controlo A2 normal, na posição 4 está o controlo das frações AFSC e na posição 6 o controlo A2 patológico. As restantes posições foram ocupadas por amostras de utentes (1 e 7) e amostras do controlo externo de qualidade (3 e 5). O esquema de migração indica que a variante HbC migra em conjunto com a fração HbA2.

Figura 28. Gel de agarose após eletroforese da hemoglobina e esquema de migração das frações. Foto: SPC de Tomar

Após a migração e coloração do gel, este é digitalizado e através de um programa informático específico, é criado um gráfico com os picos referentes às diferentes frações obtidas com a separação no gel.

3.5.6 Contagem de Células – Líquidos Biológicos

Por vezes, os médicos pedem a contagem de células em líquidos biológicos, tais como líquido pleural, ascítico, peritoneal, dialisado e sinovial. A contagem de células nestes líquidos, é, por norma, feita na câmara de Neubauer (Fig. 29). Para minimizar interferências, se o líquido for hemático, são adicionadas uma ou duas gotas de ácido acético a fim de destruir os glóbulos vermelhos. Para a preparação da câmara de Neubauer coloca-se uma

lamela por cima e posteriormente, com uma pipeta de Pasteur, coloca-se o líquido nos locais dos retículos, tendo o cuidado de não introduzir bolhas nem líquido derramado. Depois de preparada, a câmara de Neubauer deve ficar em atmosfera húmida que é conseguida colocando uma gaze molhada numa caixa de petri. A contagem é feita nas quatro quadrículas A a D (Fig. 29) e obtém-se o resultado calculando a seguinte fórmula [26]:

$$Y = \text{Leucóцитos}(células/mm^3) = \frac{n}{a} \times 10 \times d$$

$$Y/mm^3 \Leftrightarrow Y/1000 \times 10^9/L$$

a – nº de quadrículas contadas
 10 – Fator de conversão
 d – diluição
 y – nº leucóцитos/mm³
 n – nº leucóцитos contados

Após esta contagem, é necessário realizar a contagem diferencial para perceber qual o tipo de leucóцитos predominante. Para tal, são feitos dois esfregaços, a partir do sedimento obtido por centrifugação do líquido, um da mesma forma que o sangue periférico e outro com espalhamento com uma zaragatoa. São corados da mesma forma que o esfregaço de sangue periférico e é feita a contagem diferencial ao microscópio pelo TSS/MPC, que indica o predomínio.

Embora mais raramente, também é pedida a contagem de células no LCR, que é realizada num tipo de câmara específica, câmara de Funch-Rosenthal (Fig. 29). Da mesma forma, se o LCR for hemático, é adicionado o ácido acético. No entanto, se forem observadas novamente formas semelhantes aos eritróцитos, é recomendado realizar o exame a fresco com tinta da china para fazer o despiste de *Cryptococcus* spp. Se forem observadas formas encapsuladas, é indicada a presença de formas suspeitas de *Cryptococcus* spp. Na câmara de Funch-Rosenthal contagem é diferente, sendo que 5 quadrículas (A a E) representam um mm³. O resultados é dado em: Nº de Leucóцитos/mm³

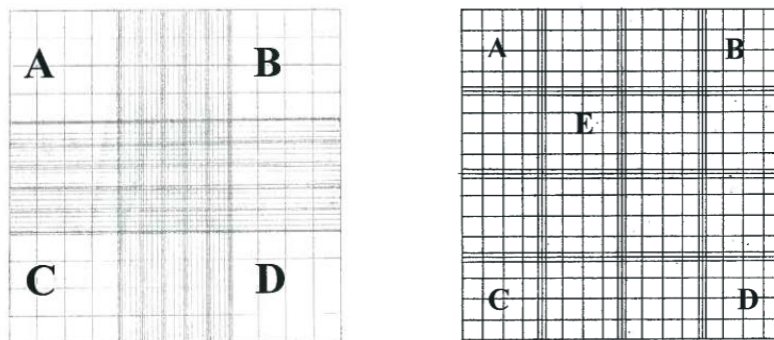


Figura 29. Esquemas da câmara de Neubauer (à esquerda) e Funch-Rosenthal (à direita) [26, 27].

3.5.7 Validação

A validação em hematologia é realizada pelo TSS/MPC e requer muito conhecimento para ser possível interpretar os valores apresentados pelos equipamentos, quer dos contadores hematológicos, quer dos equipamentos da coagulação. No caso dos hemogramas, são vistos todos os parâmetros fornecidos pelo equipamento e qualquer resultado que esteja fora dos valores de referência, tendo em conta a idade e o sexo, é visto atenciosamente. A primeira ação deve ser a consulta do histórico do doente. Muitas vezes, as alterações dos valores são devido a situações crónicas, já diagnosticadas, em que não é necessário ser feita a observação do esfregaço de sangue periférico, pois o hemograma serve apenas de monitorização. Caso o doente não tenha histórico no SPC, alterações nos valores levam à observação do esfregaço de sangue periférico. Os casos mais frequentes são a anemia e a trombocitopenia. No primeiro caso, após ser observado o ESP, o TSS/MPC coloca no sistema informático, as informações mais relevantes para o clínico, classificando a anemia, utilizando uma escala (+ a +++) para indicar a severidade. No segundo caso, o TSS/MPC pede para ser verificada a existência de coágulo na amostra. Se existir coágulo, a amostra é rejeitada, se não for detetado coágulo, é pedido o ESP e é despistada uma possível causa da trombocitopenia como por exemplo, a existência de agregados plaquetares. Como a presença destes agregados pode dever-se a uma reação com o anticoagulante EDTA faz-se a repetição da colheita para um tubo com citrato trisódico.

No caso da validação da hemostase, também o histórico do doente é avaliado. No caso do pedido ser feito a partir da consulta de hipocoagulação oral, em que é apenas para monitorização, os valores apresentados pelos equipamentos são validados. Se for um utente sem histórico, alterações significativas nos valores levam à repetição do teste para fazer uma confirmação do valor. Após confirmado, é validado e é dada a informação ao clínico de que o valor foi confirmado.

Em relação à hemoglobina glicada (HbA1c), o equipamento fornece o doseamento desta fração em conjunto com os doseamentos de HbA1a, HbA1b, HbLA1c e HbA0. O total destas frações é de cerca de 100% e só com esse total é que o resultado é validado. Caso contrário, o TSS/MPC tenta perceber qual o erro e repetir a amostra.

Na eletroforese das proteínas, é comparado o gráfico dos picos com as bandas do gel e com os doseamentos das frações HbA, HbF, HbA2, HbC e HbS obtidos no programa β -talassémias do equipamento Variant™II. Se tudo estiver normal e concordante, o resultado é validado. Se houver alguma fração com valor superior ao normal ou que os valores não

estejam concordantes quando comparado o gel e os doseamentos, é sugerida a repetição do teste.

3.5.8 Controlo de Qualidade

Como nos outros setores, também neste é realizado o CQI, que consiste na passagem dos controlos necessários no início do dia. No contador hematológico são passados 2 níveis por dia, alternado entre o nível normal, alto e baixo. No equipamento da VS, é feita a manutenção semanal com passagem dos controlos e esvaziamento do esgoto. Nos equipamentos da coagulação, é também feita uma manutenção semanal. No equipamento que realiza as análises de rotina, os controlos são feitos todos os dias e no equipamento que faz a coagulação especial, tem controlos próprios que têm de ser preparados no dia e com diferentes especificações.

O CQE é realizado através de vários programas de Avaliação Externa de Qualidade. Na hematologia, o controlo externo para a coagulação, para a hemoglobina glicada e para os contadores hematológicos fica a cargo do programa RIQAS. O programa PNAEQ-INSA envia amostras para controlo da morfologia do sangue periférico e da eletroforese da hemoglobina. A contagem de reticulócitos e a velocidade de sedimentação são controlados pelo programa LabQuality.

Os programas de AEQ enviam amostras mensalmente para o SPC para serem manipuladas como se tratassem de amostras de doentes e serem feitas as análises às quais estão destinadas. Em conjunto com a amostra, que pode estar em estado liofilizado ou pronta a usar, vêm instruções de trabalho com indicações dos testes a realizar, do prazo de entrega dos resultados e no caso da morfologia do sangue periférico vêm indicações do histórico do paciente e um formulário de resposta, que tem de ser posteriormente entregue para poder ser avaliado.

Os vários programas enviam depois os relatórios com as respostas corretas e os resultados do laboratório em relação a cada amostra. Se existirem resultados errados, é investigado o possível erro e caso seja possível, feita a correção necessária.

4. Conclusão

A terminar o meu percurso académico, sinto-me feliz e confiante de que escolhi o percurso certo.

O estágio que o Mestrado em Análises Clínicas inclui permite perceber, na prática, o que é o dia-a-dia de um laboratório de análises clínicas. Considero que o Mestrado nos dá bases teóricas suficientes para a rotina de um laboratório, mas penso que seria benéfico que a vertente prática fosse mais explorada. Durante o estágio apercebi-me também da importância das questões monetárias e de que é necessário rentabilizar custos sem nunca prescindir da qualidade. Para além disso, notei a falta de comunicação da parte dos clínicos, que é muitas vezes de extrema importância para uma validação adequada dos resultados. Apesar destas questões, no laboratório todos profissionais trabalham para dar resposta atempada e adequada aos pedidos feitos e o fato de ter passado pelas quatro valências principais, deu-me uma visão geral da rotina de um laboratório e permitiu perceber que, até mesmo nas áreas em que na teoria não eram tão motivadoras para mim, a prática trouxe essa motivação. Reunindo as áreas em que já estava motivada para trabalhar e aquelas em que adquirir a motivação necessária, concluo que trabalhar num laboratório de análises é o que quero fazer na minha vida profissional.

5. Bibliografia

1. Valente, C. *et al.* Diagnóstico Serológico de Algumas Doenças Infecciosas. Acta Médica Portuguesa, 1993; 6; 605-612.
2. Carvalho, Luiza H. F. R., Mononucleose Infecciosa, Jornal de Pediatria, 1999.
3. Cooper, G., Levey-Jennings Charts & Westgard Rules, Basic Lessons in Laboratory Quality Control, Bio-Rad Laboratories, Inc., Quality Systems Division, 2008.
4. CHMT. Instrução de Trabalho. Culturas Primárias. IT.SPC.038.00. 2014.
5. CHMT. Instrução de Trabalho. Colorações Automática e Manual. IT.SPC.034.00. 2014.
6. Fonseca, A.B. *et al.* – Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge/Programa Nacional de Controlo de Infeção, 2004.
7. Perry, J., Davies, A, Butterworth, L., Hopley, A., Nicholson, A., Gould, F., Development and Evaluation of a Chromogenic Agar Medium for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42: 4519-4523
8. Vandepitte J. *et al* - Basic laboratory procedures in clinical bacteriology, 2nd edition, World Health Organization Geneva, 2003, ISBN 92 4 154545 3.
9. Baron E. J. *et al.*, A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM), 2013, p. 47.
10. Heejung, K., Wan, K., Myungsook, K., Evaluation of a Rapid Membrane Enzyme Immunoassay for the Simultaneous Detection of Glutamate Dehydrogenase and Toxin for the Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. Ann Lab Med, 2014, 34:235-239.

11. CHMT. Instrução de Trabalho. Prova de Sensibilidade à Optoquina. IT.SPC.041.00. 2014.
12. Fernandes, Sofia *et al.*, Sociedade Portuguesa de Pediatria Consensos e Recomendações: Protocolo de parasitoses intestinais, Acta Médica Portuguesa, 2011.
13. Zeibig, Elizabeth A. Clinical Parasitology: A clinical approach, 2nd edition, 2013, p. 80-85.
14. Forbes, Betty A., Sahm, Daniel F., Weissfeld, Alice S., Diagnostic Microbiology. 11th edition. 2002.
15. Takashi, T., Nakayama, T., Novel Technique of Quantitative Nested Real-Time PCR Assay for *Mycobacterium tuberculosis* DNA, Journal of Clinical Microbiology, 2006, p. 1029-1039.
16. CHMT. Instrução de Trabalho. Controlo de Qualidade Interno e Testes de Identificação e Suscetibilidade aos Antibióticos em Equipamento Automático. IT.SPC.045.00. 2014.
17. Xavier, Ricardo M., *et al*, Laboratório na Prática Clínica: Consulta Rápida, Porto Alegre: Artmed, 2^a edição, 2011.
18. Bain, Barbara J. *et al.*, DACIE and LEWIS Practical Haematology, 11th Edition. 2011.
19. Münster, Marion, Melhoramento e Desenvolvimento Educacional da Sysmex, SEED Hematologia, N°4, 2012.
20. Bacall, Nydia S., Analisador automático hematológico e a importância de validar novos equipamentos em laboratórios clínicos, Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2009, 31(4), 218-220.
21. Rodak, Bernadette F., Carr Jacqueline H., Clinical Hematology Atlas, 4th Edition, 2013.
22. Burtis, Carl A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E., Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Edition, p. 510, 2008.

23. Caquet, René, Guia Prático de Análises Clínicas, 1ª edição, 2004.
24. Chiuso, Fernanda, *et al.*, Avaliação do desempenho dos reagentes do tempo de tromboplastina parcial ativada utilizados para detectar o anticoagulante lúpico, J Bras Patol Med Lab, v41, n°3, p. 159-64, 2005.
25. George, F. H. M., Norme da Direção-Geral da Saúde, Prescrição e Determinação da Hemoglobina Glicada A1c, Norma N° 033/2011, Atualizada em 2012.
26. CHMT. Instrução de Trabalho. Contagem de Células em Líquidos Biológicos (Ascítico; Peritoneal; Pleural; Dialisado e Sinovial). IT.SPC.018.00. 2013.
27. CHMT. Instrução de Trabalho. Contagem de Células no Líquido Céfalo Raquídeo. IT.SPC.019.00. 2013.

Websites:

<http://www.chmt.min-saude.pt/chmt/CentroHospitalar/Apresentacao>. (Acedido a 26/01/16 às 13h15).

<https://www.bd.com/ds/technicalCenter/dsi/dsi-MYCOPREP.pdf> (Acedido a 3/3/2016 às 11h03).

<http://www.cenapro.com.br/noticias-detalhes.asp?codigo=332> (Acedido a 13/05/2016 às 09h52).

<http://www.ngsp.org/docs/IFCCstd.pdf> (Acedido a 26/04/2016, às 14h30).

ANEXOS

Anexo I. Equipamentos do setor de Bioquímica/Imunologia com especificação do método usado, os parâmetros realizados em cada equipamento e os respectivos valores de referência.

Equipamentos Bioquímica/ Imunologia	Método	Parâmetros	Valores de Referência
SYNCHRON DxC®800 I e 2 *parâmetros realizados apenas no DxC 1	Potenciometria indireta, fotometria (colorimetria e turbidimetria)	Ácido Úrico	F 2.3-6.6 mg/dL M 4.4-7.6 mg/dL
		Albumina	A 3,5-4,8 g-/dL
		ALP	A 38-126 IU/L
		ALT	F 17-63 U/L M 14-54 U/L
		Amilase	A 28-100 U/L
		AST	A 15-41 U/L
		Bilirrubina total	A 0,30-1,20
		Cálcio	A 2.2-2.6 mmol/L
		CK	F 26-140 IU/L M 38-75 IU/L
		Cloro	A 98-107 mmol/L
		Colesterol HDL	A 0-100 mg/dL
		Colesterol Total	A 0-190 mg/dL
		Creatinina	F 0,4-1,0 mg/dL M 0,7-1,2 mg/dL
		Ferro	F 50.0-170.0 µg/dL M 65.0-175.0 µg/dL
		Fósforo	A 0.8-1.6 mmol/L
		GGT	A 7-64 IU/L
		Glicose	A 74-106 mg/dL
		LDH	A 0-248 IU/L
		Lipase	A 22-51 U/L
		Potássio	A 3,5-5,1 mmol/L
		Magnésio	A 1.6-2.5 mg/dL
		Sódio	A 136-144 mmol/L
		Proteínas totais	A 6.4-8.3 g/dL
		Triglicéridos	A 70-150 mg/dL
		Ureia	A 11-50 mg/dL
		Bilirrubina direta	A 0.00-0.20 mg/dL
		PCR	A 0.00-0.75 mg/dL
		TASO	A 0-100 UI/mL
		Carbamazepina*	A 4-12 µg/mL
		Digoxina*	A 0.8-2 ng/mL
		Fenitoína*	A 10-20 µg/ml
		Lítio*	NA
		Teofilina*	A 10-20 µg/mL
Ácido Valpróico	A 50-100 µg/mL		
Acetaminofeno*	A 10-30 µg/mL (terapêutico)		
Álcool etílico*	NA		
CKMB*	A < 24 U/L		
ADA*	A 4.8-23.1 U/L		
Colinesterase*	F 4.62-11.5 kU/L M 3.93-10.8 kU/L		
CH50*	A 35-59 U/mL (15-150 anos)		

<i>UniCel Dxl 800®</i>	Imunoensaio Quimioluminiscente	Ferritina	F 11-306.8 µg/L M 23.9-336.2 ug/L	
		Ácido Fólico	A 7-45.1 nmol/L	
		Vitamina D	A 30-100 ng/mL	
		Vitamina B12	A 85-378 pmol/L	
		PTH	A 12-88 pg/mL	
		Insulina	A 6-27 um/L	
		ACTH	A 0-46 pg/mL	
		ATG	A 0-4 UI/mL	
		ATPO	A 0-9 UI/mL	
		Fosfatase alcalina óssea	NA	
		Hormonas da Fertilidade		
		Estradiol	F 55-206 pmol/L	
		Progesterona	NA	
		Testosterona	F 0-2.6 nmol/L M 6.07-27.1 nmol/L	
		LH	M 0.8-7.6 UI/L	
		FSH	M 0.7-11.1 UI/L	
		Prolactina	F 1.9-25 µg/L M 2.5-17 µg/L	
		Hormonas tiroideias		
		T3 livre	A 2.5-3.9 pg/mL	
		T4 livre	A 0.61-1.12 ng/dL	
		T3 total	A 87-178 ng/dL	
		T4 total	A 6.1-12.2 µg/dL	
		TSH	A 0.34-5.6 µUI/mL	
		Marcadores tumorais		
		CEA	A 0.0-3.0 ng/mL	
		CA 19 9	A 0.0-35.0 U/mL	
		CA 15.3	A 0-31.3 U/mL	
		CA 125	F 0.0-21.0 ULmL	
		αfetoproteína	A 0-5.5 UI/mL	
		PSA total	M 0.0-4.0 ng/mL	
		PSA livre	M 0-0.14 ng/mL	
		Access®2 Immunoassay System	Imunoensaio Quimioluminiscente	Cortisol
Cortisol, U24H	A 160-1112 nmol/24			
Tiroglobulina	A 1.15-130.77			
Troponina I	A 0-0.03 ng/mL			
IMMAGE®	Nefelometria e Turbidimetria	α1 Anti-tripsina	A 88-174 mg/dL (16-150 anos)	
		β2 Microglobulina	A 1.1-2.4 mg/L	
		C3	A 79-152 mg/dL	
		C4	A 16-38 mg/dL	
		Cadeias leves Kappa	A 6.29-13.50 g/L (16-150 anos)	
		Cadeias leves Lamba	A 3.13-7.23 g/L (16-150 anos)	
		Relação Kappa/Lamba	1.50-2.00	
		Ceruloplasmina	A 22-58 mg/dL	
		Fator reumatoide, doseamento	A 0-20 UI/ml	
		IgA	A 0.82-4.53 g/L	

		IgE total	A 0.0-165.0 UI/ml
		IgG	A 7.51-15.60 g/L
		IgM	A 0.46-3.04 g/L
		IgD	A 1.3-152.7 mg/L
		Lipoproteína (a)	F 5.7-31.2 mg/dL M 5.6-33.8 mg/dL
		Microalbuminúria, U	A 0-19 mg/L
		Transferrina	A 230-430 mg/dL
		Saturação Transferrina	20-50%
VIDAS®	Enzyme Linked Fluorescent Assay (ELFA)	Toxoplasma IgM	NA
		Toxoplasma IgG II	
		CMV IgM	
		CMV IgG	
		Rubéola IgM	
		Rubéola IgG II	
		Epstein Barr IgG	
		Epstein Barr IgM	

		Alergias	
<i>ImmunoCAP™ 250</i>	Imunoensaio fluoroenzimático (FEIA)	Alergénios de Rastreio	NA
		Epitélio de Animais	
		Acaros	
		Ervas Infestantes	
		Gramíneas	
		Fungos	
		Ovo, Leite, Derivados	
		Peixes	
		Carnes	
		Frutos	
		Sementes e frutos secos	
		Autoimunidade	
	MPO, doseamento	NA	
	PR3, doseamento		
	CCP		
	Ac. AntiB2 Glicoproteína IgM e IgG		
	Ac. Anti Cardiolipinas IgM e IgG		
<i>EUROBlotMaster</i>	Western Blot	ImunoBlot	NA
<i>MAGO Plus</i>	Imunofluorescência indirecta (IFI), Imunoensaio enzimático (ELISA)	ANA (IFI)	NA
		ANA (ELISA)	
		ANCA (pANCA e cANCA)	
		Ac. Anti dsDNA	
		ASMA	
		AMA	
		Ac. Anti Fosfolípidos	
		Aldosterona (Doseamento)	
		NSE (Doseamento)	
		Ac. Anti <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
		Ac. Anti <i>Chlamidophila pneumoniae</i>	

		Urina Tipo II	
		Densidade	A 1.010-1.025
		Cor	-----
		Turvação	-----
		Glicose	A 0-30 mg/dL
		Proteínas	A 0-10 mg/dL
		pH	A 5-8
		Hemoglobina	A 0-0.03 mg/dL
		Corpos cetônicos	A 0-5 mg/dL
		Urobilinogênio	A 0-0.2 mg/dL
		Nitritos	-----
		Leucócitos	A 0-25 / μ L
		Bilirrubina	A 0-0.2 mg/dL
<i>Aution Max AX42-80</i>	Refletância, índice de refração, dispersão de luz		
<i>Hydrasys</i>	Eletroforese em gel de agarose	Eletroforese de proteínas séricas	-----

A- Ambos; F-Feminino; M- Masculino; N- Negativo; P- Positivo; ALP- Fosfatase Alcalina; ALT- Alanina Aminotransferase; AST- Aspartato Aminotransferase; CK- Creatina Cinase; GGT- Gama Glutamil Transferase; LDH- Lactato Desidrogenase; PCR- Proteína C Reativa; TASO- Título Anti Estreptolisina O; CK MB - Creatina Cinase, MB; ADA- Adenosina Desaminase; CH50- Proteína complemento; PTH- Paratormona; ACTH- Hormona Adrenocorticotrópica; ATG- Anticorpo Anti Tiroglobulina; ATPO- Anticorpo Anti Peroxidase; LH- Hormona Luteinizante ; FSH- Hormona Estimuladora do Folículo; T3- triiodotironina; T4- tiroxina TSH- Hormona Estimuladora da Tireoide; CEA- Carcinoembryonic Antigen ; CA 19.9- Carbohydrate antigen 19.9; CA 15.3- Carbohydrate antigen 15.3; CA 125- Carbohydrate antigen 125; PSA- Antigênio Específico da Próstata; C3- Proteína complemento; C4- Proteína Complemento; IgA- Imunoglobulina A; IgE- Imunoglobulina E; IgG- Imunoglobulina G; IgM- Imunoglobulina M; IgD- Imunoglobulina D; CMV- Citomegalovírus; MPO- Mieloperoxidase; PR3- Proteinase 3; CCP- Anticorpo Anti Péptido Citrunado Cíclico. Ac- Anticorpo; ANA- Ac. Anti Nucleares e Citoplasmáticos; ANCA- Ac. Anti Citoplasma do Neutrófilo; pANCA- ANCA perinuclear; cANCA- ANCA citoplasmático; AMA – Ac. Anti Mitocôndria; ASMA – Ac. Anti Músculo Liso Actina; NSE- Enolase Neuro Específica; NA – Não Aplicável

Anexo II. Equipamentos do setor de Microbiologia com especificação do método usado e os

Equipamentos Microbiologia	Método	Parâmetros
VITEK 2	Colorimetria Turbidimetria	Identificação de bactérias e leveduras Antibiograma
MicroScan WalkAway 96	Colorimetria Turbidimetria	Identificação de bactérias e leveduras Antibiograma
Bactec 9120	Fluorescência	Deteção de crescimento de microrganismos
Bactec 9000	Fluorescência	Deteção de crescimento de micobactérias
GeneXpert	RT-PCR e Multiplex PCR	Deteção de ARN dos vírus de gripe A, gripe B e gripe H1N1 2009 Deteção de ADN do complexo <i>Micobacterium tuberculosis</i>
	PCR em Tempo Real e NESTED PCR	Deteção de resistência à rifampicina (associada a mutações do gene <i>rpoB</i>)

parâmetros realizados no respetivo equipamento.

ARN- Ácido Ribonucleico; ADN-Ácido Desoxirribonucleico; RT-PCR- Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction; PCR- Polymerase Chain Reaction;

Coloração de Gram –
Programa 00

Coloração Ziehl-Neelsen
Modificada (Kinyoun) –
Programa 01

Coloração por Auramina –
Programa 02

Anexo III. Corantes e respetivos tempos das três colorações realizadas no PolyStainer [7].

<i>Cristal Violeta – 1 min</i>	<i>Fucsina – 4 min</i>	<i>Auramina – 15 min</i>	
<i>Água corrente – 1,5 min</i>	<i>Água corrente – 30 seg</i>	<i>Água corrente – 40 seg</i>	Min-
<i>Iodina – 1 min</i>	<i>Descorante ZN – 5 seg</i>	<i>Descorante ZN – 40 seg</i>	minuto
<i>Água corrente – 1 min</i>	<i>Água corrente – 30 seg</i>	<i>Água corrente – 30 seg</i>	s; Seg-
<i>Descorante – 1 min</i>	<i>Azul de Metileno – 30 seg</i>	<i>Fucsina – 2 min</i>	segund
<i>Água corrente – 1 min</i>	<i>Água corrente – 30 seg</i>	<i>Água corrente – 30 seg</i>	os
<i>Safranina – 1 min</i>	<i>Secagem – 3 min</i>	<i>Secagem – 3 min</i>	
<i>Água corrente – 1 min</i>			
<i>Secagem – 1,5 min</i>			

Anexo

IV. Condições de incubação por produto microbiológico.

<i>Produto</i>	<i>Meio</i>	<i>Estufa</i>	<i>Temperatura de incubação</i>	<i>Tempo de incubação</i>
<i>Urina</i>	CLED	Aerobiose	35 ± 2°C	18 a 24h
<i>Hemoculturas</i>	GS	Aerobiose + CO ₂	35 ± 2°C	18 a 24h
<i>Medula Óssea e LCR</i>	GS	Aerobiose + CO ₂	35 ± 2°C	18 a 24h
	PVX	Aerobiose + CO ₂		
<i>Ponta de Cateter</i>	BHI (LCR)	Aerobiose		
	GS	Aerobiose + CO ₂	35 ± 2°C	18 a 24h
<i>Líquidos de Serosas</i>	GS	Aerobiose + CO ₂	35 ± 2°C	
	PVX	Aerobiose + CO ₂		18 a 24h
	BHI	Aerobiose		
<i>Exsudados/Coleções Purulentas</i>	GS	Aerobiose + CO ₂	35 ± 2°C	18 a 24h
	MAC	Aerobiose		
	BHI	Aerobiose		
	HAE	Aerobiose + CO ₂		
	MRSA	Aerobiose		
	VCAT	Aerobiose + CO ₂		
<i>Biópsias e Material de Próteses</i>	CAN	Aerobiose		Até 72h
	GS	Aerobiose + CO ₂	35 ± 2°C	18 a 24h
	BHI	Aerobiose		
<i>Secreções Respiratórias</i>	GS	Aerobiose + CO ₂	35 ± 2°C	18 a 24h
	HAE	Aerobiose + CO ₂		18 a 24h
	SCG	Aerobiose		Até 72h
<i>Fezes</i>	HEK	Aerobiose	35 ± 2°C	18 a 24h
	YER	Aerobiose	35 ± 2°C	18 a 24h
	CAMPY	Microaerofilia	42°C	48 a 72h
	MAC	Aerobiose	35 ± 2°C	18 a 24h
	Selenito	Aerobiose	35 ± 2°C	18 a 24h

CLED- Cistina, Lactose, Deficiente em eletrólitos; GS- Gelose Sangue; PVX- PolyVitex; BHI- Brain Heart Infusion; LCR- Líquido Cefalo Raquídeo MAC- Gelose MacConkey; HAE- Gelose *Haemophilus spp*; MRSA- Meticilin Resistent *Staphylococcus aureus*; VCAT- Vancomicina, Colistina, Anfotericina, Trimetoprim; CAN- Gelose *Candida spp*; SCG- Sabouraud Cloranfenicol Gentamicina; HEK- Gelose Hektoen; YER- Gelose *Yersinia spp*; CAMPY- Gelose Campyloset

Anexo V. Tabela de Murray e Washington

	<i>Células Epiteliais (ampliação 10x)</i>	<i>Leucócitos (ampliação 10x)</i>
<i>Grupo 1</i>	25	10
<i>Grupo 2</i>	25	10-25
<i>Grupo 3</i>	25	25
<i>Grupo 4</i>	10-25	25
<i>Grupo 5</i>	<10	25

Anexo VI. Equipamentos do setor de Microbiologia com especificação do método usado, os parâmetros realizados em cada equipamento e os respectivos valores de referência.

<i>Equipamentos Hematologia</i>	<i>Método</i>	<i>Parâmetros</i>	<i>Valores de Referência</i>
<i>Sysmex XE-2100 Sysmex XT-1800i</i>	<i>Citometria de fluxo, impedância, SLS- hemoglobina</i>	Hemograma	
		Eritrócitos	M 4.5-5.5 10 ¹² /L F 3.8-4.8 10 ¹² /L
		Leucócitos	A 4.0-10.0 10 ⁹ /L
		Neutrófilos	A 1.5-7.0 10 ⁹ /L
		Linfócitos	A 1.0-3.7 10 ⁹ /L
		Monócitos	A 0.0-0.7 10 ⁹ /L
		Eosinófilos	A 0.0-0.4 10 ⁹ /L
		Basófilos	A 1.0-2.0 %
		Hemoglobina	M 13.0-17.0 g/dL F 12.0-15.0 g/dL
		Hematócrito	M 40.0-50.0 % F 36.0-46.0 %
		VCM	A 80.0-100.0 fL
		HCM	A 27.0-32.0 pg
		CHCM (cálculo)	A 32.0-35.0 g/dL
		RDW	A 11.6-14.0 %
		Plaquetas	A 150-400 10 ⁹ /L
		VPM	A 8.2-9.7 fL
		PDW	A 9.0-17.0 %
Plaquetócrito	A 0.17-30.0 %		
Reticulócitos	A 50-100 10 ⁹ /L		
		TP	A 9.6-14.4 seg

STA Compact Max (x2)	imunoturbidimetria	INR	A 0.80-1.20
		aPTT	A 25.4-34.3 seg
		D-Dímeros	A 0-500 µg/L
		Fibrinogénio	A 2.38-4.98 g/L
		Tempo Trombina	A 0-21 seg
		Antitrombina III	A 80-130%
		F vW	A 60-150%
Test I THL	Fotometria capilar de fluxo (análise cinética)	Fator VIII, Velocidade de teína S livre Sedimentação	F (51) 4-14 mm/h M (58) 3-9 mm/h (50-60 anos)
VARIANT™ II Hemoglobin Testing System	Cromatografia de Alta Resolução (HPLC)	Doseamentos das frações de Hemoglobina (A1C, F, A2)	HbA1C IFCC: 20-42 mmol/mol HbA1C DCCT: 4-6 %
HYDRASYS	Eletroforese em gel de agarose	Eletroforese de Hemoglobina	-----

A- Ambos; F- Feminino; M- Masculino; VCM- Volume Corpuscular Médio; HCM- Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM- Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; RDW- Red Cell Distribution Width; VPM- Volume Plaquetar Médio; PDW- Platelets Distribution Width; TP- Tempo de Protrombina; INR- International Normalized Ratio; aPTT- Activated Partial Thromboplastin Time; F vW- Fator von Willebrand; HbA1C- Hemoglobina Glicada; HbF- Hemoglobina Fetal;