Marta Sofia Prazeres Teixeira

Relatório de Estágio
Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Gabriela Silva, pela Dra. Maria Beatriz Tomaz e pela Dra. Filipa Silva e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2018

· U C ·

Universidade de Coimbra

Marta Sofia Prazeres Teixeira

Relat·rio de Est§gio

Mestrado em An§lises Cl²nicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Gabriela Silva, Dra. Maria Beatriz Tomaz e Dra. Filipa Silva

apresentado ¨ Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2018

· U C ·

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

“Education is not the learning of facts, but the training of the mind to think”

Albert Einstein

Agradecimentos

Ao chegar ao fim desta longa e árdua, mas estimulante etapa, quero expressar o meu sincero agradecimento a algumas pessoas que de uma maneira direta ou indireta contribuíram para o meu desenvolvimento enquanto profissional e até mesmo pessoal.

À Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa, coordenadora do Mestrado em Análises Clínicas, pela disponibilidade e principalmente pelo apoio demostrado durante a procura do local para o desenvolvimento do estágio. Foi um momento difícil e um pouco de desanimo até, que sem a sua motivação teria sido complicado de ultrapassar.

À Professora Doutora Leonor Martins Almeida, coordenadora do Mestrado no meu primeiro ano de estudos, por todo o conhecimento transmitido e ajuda prestada.

À Professora Doutora Gabriela Conceição Duarte Jorge Silva, minha orientadora interna, por todo o auxílio durante a escrita deste relatório. Pela sua prontidão, mostrando-se sempre disponível, para o esclarecimento de qualquer dúvida que possuísse.

A todos os meus Professores que, durante estes dois anos, me transmitiram, não só conhecimentos, mas também experiencias de vida que guardarei para sempre.

À administração do Laboratório Labeto-Centro de Análises Bioquímicas, S.A., por me ter recebido atempadamente e por me ter proporcionado dois cursos de formação profissional intitulados "A Fase Pré-Analítica" e "Conceitos Práticos de Flebotomia" lecionados pela Dra. Isabel Bento, a quem deixo também um sincero obrigada. Em particular quero agradecer à Dra. Maria Beatriz Tomaz, minha orientadora externa, por ter possibilitado a realização deste estágio e por sempre me ter ajudado em todas as questões, disponibilizando-me informações cruciais para o desenvolvimento de todo o trabalho. À Dra. Sara Brígido, pelos ensinamentos prestados durante vários meses na prática da flebotomia e pela partilha de toda a sua experiência profissional.

Ao Dr. Ricardo Castro, diretor do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar de Leiria, por ter permitido a minha passagem nas várias áreas do laboratório. Foi por um breve período, no entanto sem ele não beneficiaria dos ensinamentos de como funcionam as Análises Clínicas no meio hospitalar. À Dra. Filipa Silva, minha orientadora externa, por tudo o que me ensinou, pela total disponibilidade para esclarecer todas as minhas dúvidas e por todo o apoio demostrado durante o tempo que estive a seu lado. Quero também agradecer à Dra. Gina Marrão, pelo acompanhamento e elucidação acerca de vários temas de extrema

importância no mundo da Microbiologia. Mostro ainda a minha gratidão por ter contactado com pessoas como a Dra. Sandrine Mendes, Dr. Jorge Pinheiro e Joana Bernardino, que de certa forma contribuíram para o meu crescimento e me proporcionaram um período muito agradável no hospital.

Aos meus pais, que sempre fizeram de tudo para me facultar este Mestrado e que acreditaram em mim, sem eles nada disto seria possível.

A todos os meus amigos, agradeço a força, a ajuda e paciência que mostraram, sei que nem sempre foi fácil.

Índice

I. Introdução **1**

II. Caraterização do Laboratório de Estágio **3**

2.1 Laboratório Beatriz Godinho 3

2.2 Centro Hospitalar de Leiria 8

III. Gestão e Controlo de Qualidade **13**

3.1 Laboratório Beatriz Godinho 13

3.2 Centro Hospitalar de Leiria 14

IV. Hematologia **15**

4.1 Hematopoiese 15

4.2 Amostras 17

4.3 Hemograma 18

4.3.1 Metodologia dos equipamentos 18

a. ADVIA® 2120 (Siemens) 18

b. Sysmex XE-5000™ 22

4.3.2 Significado dos parâmetros avaliados 26

4.3.3 Esfregaço de Sangue Periférico 30

a. Morfologia dos eritrócitos e patologias associadas 32

b. Morfologia e alterações quantitativas dos leucócitos e patologias associadas 36

c. Morfologia e alterações quantitativas das plaquetas e patologias associadas 38

4.3.4 Anemia 40

4.3.5 Leucemia 41

4.4 Hemoglobina 41

4.4.1 Hemoglobina glicada 42

4.4.2 Eletroforese da Hemoglobina 44

a. Anomalias Qualitativas da Hemoglobina 44

b. Anomalias Quatitativas da Hemoglobina 45

4.5 Velocidade de Sedimentação 46

V. Microbiologia **49**

5.1 Produtos Biológicos 52
5.1.1 Urina 52
a. Colheita 53
b. Processamento laboratorial 53
c. Interpretação de resultados 53
5.1.2 Sangue 54
a. Colheita 55
b. Processamento laboratorial 56
c. Interpretação de resultados 57
5.1.3 Fezes 58
a. Colheita 59
b. Processamento laboratorial/Interpretação de resultados 59
5.1.4 Expetoração e outras secreções respiratórias 63
a. Colheita 64
b. Processamento laboratorial/Interpretação de resultados 64
5.1.5 Líquido cefalorraquidiano 70
a. Colheita 70
b. Processamento laboratorial/Interpretação de resultados 71
5.1.6 Exsudados genitais 73
a. Colheita 73
b. Processamento laboratorial/Interpretação de resultados 74
5.2 Identificação de microrganismos 77
5.3 Antibiograma 78
VI. Conclusão 81
VII. Referências 83
VIII. Anexos 91

Índice de Figuras

Figura 1: Exemplo de uma cadeia Aptio® Automation (Siemens)……4

Figura 2: Esquema completo da hematopoiese……...16

Figura 3: Número de células na área Baso (1) do citograma BASO……19

Figura 4: Citograma PEROX……..……...……..……...20

Figura 5: Número de ocorrências na área das LUC (1) do citograma PEROX……20

Figura 6: Número de ocorrências na área dos NRBC (1) do citograma PEROX.……21

Figura 7: Citograma RBC V/HC (Volume/Concentração de Hb)..……21

Figura 8: Citograma de Dispersão PLT...……21

Figura 9: Gráfico de dispersão do Canal DIFF por citometria de fluxo fluorescente……23

Figura 10: Gráfico de dispersão do Canal WBC/BASO por citometria de fluxo fluorescente……...23

Figura 11: Gráfico de dispersão de RET, obtido por citometria de fluxo fluorescente……23

Figura 12: Gráfico de dispersão de PLT-O, obtido por citometria de fluxo fluorescente……...24

Figura 13: Gráfico de dispersão de NRBC, obtido por citometria de fluxo fluorescente…...24

Figura 14: Gráfico de dispersão de IMI, obtido por método RF/DC……...25

Figura 15: Histograma da distribuição de volumes de RBC (eritrócitos) e PLT (plaquetas), obtido por corrente contínua……25

Figura 16: Satelitismo plaquetário, à esquerda. Plaquetas agregadas, à direita……30

Figura 17: Modo correto para efetuar um esfregaço de sangue….……31

Figura 18: As diversas porções do esfregaço de sangue. 1) Cabeça; 2) Corpo; 3) Franja……31

Figura 19: Eritrócito policromatófilo……...33

Figura 20: Formas e tamanhos que os eritrócitos podem adquirir e respetivas causas……...……...34

Figura 21: Inclusões eritrocíticas……34

Figura 22: Eritroblasto basófilo……...35

Figura 23: Plasmócito no sangue periférico……37

Figura 24: Linfócito atípico no sangue periférico……38

Figura 25: Evolução celular na granulopoiese……..38

Figura 26: Megacariócito de um paciente com Mielofibrose idiopática……...39

Figura 27: Estrutura da hemoglobina……...42

Figura 28: Esquema da técnica de HPLC por afinidade ao boronato…….43

Figura 29: Cromatograma do Premier Hb9210™……..43

Figura 30: Constituição da parede celular de bactérias de Gram negativo e de Gram positivo……..49

Figura 31: Constituição da parede celular das micobactérias……50

Figura 32: Exemplo de uma sementeira de urina…….53

Figura 33: Esquema que permite estimar a concentração de bactérias na urina……53

Figura 34: Cor do sensor num frasco de hemocultura positiva e negativa……56

Figura 35: Teste de aglutinação em lâmina com soros aglutinantes. 1° OMA (soro polivalente O); 2° O:4,5 (soro monovalente O); 3° H:i (soro monovalente H)……60

Figura 36: Resultados mais comuns do CERTEST *Clostridium difficile* GDH+Toxin A+B……61

Figura 37: BAAR corados pela técnica de Ziehl-Neelsen……66

Figura 38: Células infetadas com Metapneumovírus, utilizando a técnica de imunofluorescência direta para observação da fluorescência……..69

Figura 39: Exame a fresco de trofozoíto de *Trichomonas vaginalis*……..74

Figura 40: Coloração de Gram de um exsudado vaginal com leveduras…….74

Figura 41: "Clue cells" vs. Células epiteliais vaginais normais……75

Índice de Tabelas

Tabela i: Equipamentos existentes no setor de Bioquímica e Imunologia/Endocrinologia do laboratório Beatriz Godinho……...4

Tabela ii: Equipamentos existentes no setor da Urianálise do laboratório Beatriz Godinho..5

Tabela iii: Equipamentos existentes no setor da Bacteriologia/Microbiologia do laboratório Beatriz Godinho……...5

Tabela iv: Equipamentos existentes no setor da Biologia Molecular do laboratório Beatriz Godinho……...6

Tabela v: Equipamentos existentes no setor da Autoimunidade do laboratório Beatriz Godinho……...6

Tabela vi: Equipamentos existentes no setor da Hematologia/Coagulação do laboratório Beatriz Godinho……...7

Tabela vii: Equipamentos existentes no setor da Hematologia do SPC do CHL……9

Tabela viii: Equipamentos existentes no setor da Bioquímica do SPC do CHL……9

Tabela ix: Equipamentos existentes no setor da Imunologia do SPC do CHL……10

Tabela x: Equipamentos existentes no setor da Microbiologia do SPC do CHL……11

Tabela xi: Parâmetros avaliados no Eritrograma……27

Tabela xii: Parâmetros avaliados no Leucograma……...29

Tabela xiii: Parâmetros avaliados no Plaquetograma……..29

Tabela xiv: Exemplos de Patologias que levam ao aparecimento de Macrócitos e Micrócitos……..32

Tabela xv: Exemplos de Patologias/Causas que alteram a cor dos eritrócitos……...33

Tabela xvi: Exemplos de Patologias/Causas que levam ao aparecimento de corpos de inclusão nos eritrócitos……...35

Tabela xvii: Exemplos de Patologias/Causas que levam à alteração quantitativa dos vários tipos de leucócitos……37

Tabela xviii: Exemplos de Patologias/Causas que levam à alteração quantitativa das plaquetas……40

Tabela xix: Classificação dos vários tipos de anemia……40

Tabela xx: Classificação das Leucemias……...41

Tabela xxi: Tipos de β-talassemia e suas características.....46

Tabela xxii: Causas do aumento da VS e exemplos de condições que dificultam o seu aumento……47

Abreviaturas

Ac – Anticorpo

Ag – Antigénio

ANA – Anticorpos Anti-nucleares

aPTT – Tempo de tromboplastina parcialmente ativada

ATCC – American Type Culture Collection

BASO – Basófilos

CCP – Peptídeo Citrulinado Cíclico

CHL – Centro Hospitalar de Leiria

CMI – Concentração Mínima Inibitória

DGS – Direção-Geral da Saúde

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ds-DNA – Ácido Desoxirribonucleico de dupla cadeia

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EOS – Eosinófilos

FEIA – Fluoroenzimaimunoensaio

FIA – Fluorescent Immunoassay

GM-CSF – Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

Hb – Hemoglobina

HbA1 – Hemoglobina A1

HbA1c – Hemoglobina A1 glicada

HbA2 – Hemoglobina A2

HbF – Hemoglobina fetal

HCT – Hematócrito

HGB – Concentração de Hemoglobina

HLA-B27 – Human leukocyte antigen B27

HPLC – High-performance liquid chromatography

IFI – Imunofluorescência indireta

IL-2 – Interleucina 2

IL-3 – Interleucina 3

IL-6 – Interleucina 6

INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

JCI – Joint Commission International

KPC – *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase

LCR – Líquido cefalorraquidiano

LLC – Leucemia Linfocítica Crônica

LMA – Leucemia Mielóide Aguda

LMC – Leucemia Mielóide Crônica

LMMC – Leucemia Mielomonocítica Crônica

LYM – Linfócitos

MCH – Hemoglobina Corpuscular Média

MCHC – Concentração Média de Hemoglobina Corpuscular

M-CSF – Macrophage colony-stimulating factor

MCV – Volume Corpuscular Médio

MO – Medula Óssea

MONO – Monócitos

MPV – Volume Plaquetar Médio

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

NAD – Dinucleótido de nicotinamida e adenina

NEU – Neutrófilos

NK – Natural Killer

PCR – Polymerase Chain Reaction

PDW – Dispersão do Volume Plaquetar

PLT – Plaquetas

RBC – Red Blood Cells

RDW – Dispersão do Volume Eritrocitário

RIQAS – Randox International Quality Assessment Scheme

RNA – Ácido Ribonucleico

RT-PCR – Reverse transcription polymerase chain reaction

SGQ – Sistema de Gestão da Qualidade

SNC – Sistema Nervoso Central

SPC – Serviço de Patologia Clínica

TSA – Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

TTP – Púrpura Trombocitopênica Trombótica

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

UK NEQAS – United Kingdom National External Quality Assessment Service

WBC – White blood cells

Resumo

O presente relatório refere-se ao estágio curricular desenvolvido nos meses de janeiro a julho de 2018. Este estágio foi realizado no laboratório Labeto-Centro de Análises Bioquímicas, S.A., pertencente ao Grupo Beatriz Godinho e no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar de Leiria. Como parte integrante do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, este estágio permitiu o desenvolvimento de conhecimentos, adquiridos ao longo do curso, nas diversas valências de um laboratório clínico.

Ambos os laboratórios são caracterizados globalmente, sendo explicada a forma de trabalho de cada um, as várias análises realizadas, bem como os equipamentos que fazem parte dos dois serviços. No laboratório Beatriz Godinho é feita uma pequena abordagem às colheitas de produtos biológicos, visto ter sido um dos pontos de aprendizagem durante o estágio. A área da Hematologia foi alvo de maior enfoque no laboratório Beatriz Godinho, enquanto no SPC do CHL a área da Microbiologia foi a que teve uma descrição mais profunda. Ao longo do texto todas as metodologias usadas nestas áreas laboratoriais são expostas, é realizada também uma abordagem teórica das pesquisas executadas no sentido de perceber a sua relevância numa determinada patologia.

É ainda abordado o tema da Gestão e Controlo de Qualidade e a sua importância para garantir a fiabilidade dos resultados.

Palavra-chave: Análises Clínicas, Laboratório, Hematologia, Microbiologia, parâmetros analíticos.

Abstract

The present report refers to the curricular internship that took place from January to July 2018. This internship was carried out in the laboratory Labeto-Centro de Análises Bioquímicas, S.A., which belongs to the Beatriz Godinho Group and in the Clinical Pathology Service of the Centro Hospitalar de Leiria. As an integral part of the Master´s degree in Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra, this internship allowed the development of knowledge, acquired throughout the course, in several valences of a clinical laboratory.

Both laboratories are characterized globally, explaining the way of work of each one, the various analysis performed, as well as the equipment that makes part of the two services. In the Beatriz Godinho laboratory, a small approach to biological products harvests was made, since it was one of the learning goals during the internship. The area of Hematology was the subject of greater focus in the Beatriz Godinho's laboratory, whereas in the SPC of CHL the área of Microbiology was the one with a deeper description. Throughout the report all the methodologies used in these laboratory areas are exposed, a theoretical approach of the researches is also carried in order to understand their relevance in a certain pathology.

It even addresses the issue of Quality Management System and its importance to ensure the reliability of the results.

Keyword: Clinical Analysis, Laboratory, Hematology, Microbiology, analitical parameters.

I. Introdução

As Análises Clínicas são um precioso meio auxiliar de diagnóstico onde são estudados vários fluídos biológicos. Através deste estudo é possível avaliar a função de um órgão, de um estado metabólico (metabolómica), fazer a pesquisa de um agente etiológico, estabelecendo assim a presença ou ausência de uma patologia. É possível, ainda, acompanhar a evolução da doença, monotorização terapêutica e contribuir para uma vigilância epidemiológica.

Este estágio curricular, vinculado ao Mestrado em Análises Clínicas, teve como objetivo a aplicação de conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do curso num ambiente profissional, a partilha de experiências com outros profissionais de saúde e o contacto com o utente.

O estágio decorreu em dois ambientes diferentes, o ambulatório e o hospitalar. Inicialmente, foi realizado no laboratório Labeto-Centro de Análises Bioquímicas, S.A., pertencente ao Grupo Beatriz Godinho, em Leiria, onde permaneci quatro meses. Seguidamente estive no Centro Hospitalar de Leiria, também situado em Leiria, durante dois meses.

No laboratório Beatriz Godinho tive a oportunidade de executar a fase da Pré-Analítica, onde aprendi a interpretar prescrições médicas, informar os utentes sobre as condições ideais para a realização das análises, executar colheitas de vários produtos biológicos, como sangue, exsudado vaginal, pele, cabelo, entre outros. Esta experiência ajudou-me a entender a relevância desta fase pré-analítica, que é onde a maior parte dos erros acontecem.

As condições de colheita são extremamente relevantes para a interpretação do resultado, por exemplo, análises a determinados analitos que têm ritmo circadiano, variam os valores ao longo do dia (ex: Cortisol). Para algumas colheitas há um procedimento específico que deve ser cumprido e é de lembrar que o mínimo descuido pode levar a erros, o que vai pôr em causa o resultado da análise e a sua interpretação.

Durantes estes quatro meses, as manhãs foram dedicadas às colheitas de produtos biológicos e as tardes à realização dos ensaios nas diferentes áreas do laboratório: Bioquímica, Imunologia/Endocrinologia, Serologia (técnicas não automatizadas), Bacteriologia/ Microbiologia, Urianálise, Hematologia/Coagulação, Biologia Molecular e Autoimunidade.

De todas as valências, do laboratório, escolhi a área da Hematologia, que desde o início do curso me despertou um grande interesse, observar a prática laboratorial fez-me querer aprofundar este tema de tão grande importância para a saúde humana.

A segunda fase do meu estágio teve lugar no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar de Leiria, como dito anteriormente. O Serviço responde a todos os pedidos de análises feitos nas várias áreas prescritoras do hospital, nas suas correspondentes vertentes de urgência, internamento, hospital dia e ambulatório.

É composto por uma secretaria, a sala de espera, os gabinetes de colheita e áreas laboratoriais. Pude observar durante uma semana as colheitas de ambulatório, o que me permitiu comparar alguns aspetos com o laboratório Beatriz Godinho. Tive também, a oportunidade de passar pelos laboratórios, onde permaneci uma semana na Hematologia, uma semana na Bioquímica, duas semanas na Imunologia e um mês na Microbiologia.

Estes dois meses foram cruciais para a consolidação de vários conhecimentos, onde pude comparar e notar algumas diferenças entre o meio hospitalar e o ambulatório. Saberes que a meu entender são de extrema importância para um Técnico Superior de Laboratório.

A Microbiologia, foi a área laboratorial do hospital que escolhi para aprofundar no Relatório, uma vez que sinto um enorme fascínio por todo o trabalho que é realizado diariamente na pesquisa de microrganismos em diferentes amostras biológicas.

II. Caraterização do Laboratório de Estágio

2.1 Laboratório Beatriz Godinho

O grupo de Laboratórios Beatriz Godinho surgiu com a criação do Labeto – Centro de Análises Bioquímicas, em 1974. Situado em Leiria tem Direção Técnica da Doutora Beatriz Godinho. Conta com mais de 130 postos, entre laboratórios e unidades de colheita, permitindo assim uma aproximação e melhoria na prestação de serviços ao utente.

A equipa de profissionais do laboratório é constituída por Especialistas em Análises Clínicas, Técnicos Superiores de Laboratório, Técnicos de Análises Clínicas e Enfermeiros. Conta ainda com auxiliares, alguns profissionais que asseguram a limpeza, encomendas e um bom funcionamento do laboratório e rececionistas que se encarregam da receção dos utentes, registo das análises pedidas pelo médico, assim como a anotação dos dados do utente, nomeadamente: nome, género, idade, patologias e medicação, ou outras informações cruciais para a posterior validação biopatológica.

Diariamente, chegam ao laboratório aproximadamente 1300 processos, um para cada utente. Cada processo compreende múltiplas análises, são avaliados mais ou menos 30.000 parâmetros analíticos por dia. Tal só é possível devido ao avanço tecnológico, que permite rapidez e eficácia, nos testes realizados. O laboratório possui um sistema de código de barras único para cada utente, diminuindo assim a possibilidade de troca de amostras.

Antes da chegada ao laboratório a maior parte dos produtos biológicos ainda percorre um longo caminho, visto haver postos de colheita situados a alguns quilómetros de distância. Para tal são asseguradas algumas normas, com o objetivo de as amostras biológicas chegarem ao laboratório em condições de serem analisadas. Uma delas é a utilização de malas térmicas providas de cuvetes de gelo que conservam a amostra refrigerada e ainda um termómetro para controlar a temperatura. Contudo há exceções, nem todas as amostras podem vir refrigeradas, algumas como as zaragatoas de exsudados vaginais, uretrais devem vir à temperatura ambiente, fora da mala térmica. Outro exemplo, há analitos que se degradam após exposição à luz solar, como a vitamina B12, os tubos de amostra devem vir protegidos da luz por exemplo, envolvendo-os em papel de alumínio. As amostras biológicas devem chegar ao laboratório num espaço de tempo máximo de 2 horas.

Quando chegam ao laboratório, as amostras são distribuídas pelos diferentes setores, no da Bioquímica e Imunologia/Endocrinologia existe uma cadeia que faz a triagem dos tubos de soro, a Aptio® Automation da Siemens (Figura 1).

Figura 1: Exemplo de uma cadeia Aptio® Automation (Siemens).
Fonte: (Medical, 2006)

As amostras biológicas aqui processadas podem ser: soro, obtido após formação do coágulo e centrifugação a 4.000rpm durante 10 min, plasma geralmente obtido a partir do tubo de EDTA (anticoagulante) e urina. Assim que entram na cadeia, é lido o código de barras de cada tubo e descodificados os pedidos de análises, de acordo com estes pedidos os tubos são distribuídos pelos diversos aparelhos conectados ao sistema de transporte da cadeia.

Na Tabela i é possível encontrar os diferentes equipamentos que existem neste sector.

Tabela i: Equipamentos existentes no setor de Bioquímica e Imunologia/Endocrinologia do laboratório Beatriz Godinho.

Acoplados à cadeia		**Fora da cadeia**	
Equipamento	**Determinações**	**Equipamento**	**Determinações**
ADVIA® 2400 Clinical Chemistry System (Siemens)	Bioquímica (soro e urina)	Phadia® ImmunoCAP 250 (Thermo Fisher Scientific)	Alergénios (soro)
ADVIA Centaur® XP Immunoassay System (Siemens)	Bioquímica Imunologia Endocrinologia (soro e plasma)	VIDAS® (bioMérieux)	Imunologia (soro)
IMMULITE® 2000 Immunoassay System (Siemens)	Imunologia (soro)	CAPILLARYS 2 (Sebia)	Eletroforese de proteínas (soro)

Os produtos biológicos analisados na secção da Urianálise são urina e fezes.

Na Tabela ii encontram-se os equipamentos onde se processam as análises.

Tabela ii: Equipamentos existentes no setor da Urianálise do laboratório Beatriz Godinho.

Equipamento	Determinações
sediMAX conTRUST + Aution MAX (A.MENARINI diagnostics)	Análise química e sedimento urinário (Urina tipo II)
HM-JACK arc (A.MENARINI diagnostics)	Sangue oculto nas fezes
Microscópio Ótico	Observação de parasitas nas fezes

Ao setor da Bacteriologia/Microbiologia chegam vários tipos de amostras biológicas para exames bacteriológicos, micológicos e parasitológicos. São exemplos: urina para urocultura, fezes para coprocultura, expetoração, exsudados vaginais, retais, nasais, faríngeos, auriculares, exsudados de feridas, raspados de pele e unhas, entre outros.

Nesta área do laboratório a automatização é menor dado as características particulares do tipo de análises realizadas, no entanto existem alguns equipamentos que auxiliam o trabalho dos técnicos, são eles (Tabela iii):

Tabela iii: Equipamentos existentes no setor da Bacteriologia/Microbiologia do laboratório Beatriz Godinho.

Equipamento	Determinações/Funções
VITEK® 2 (bioMérieux)	Identificação bacteriana e Antibiogramas
Câmara de fluxo laminar - TopSafe ™ (BIOAIR)	Área de trabalho estéril (Protege o técnico e as amostras de possíveis contaminações)
Estufa - Memmert™	Favorece o crescimento de microrganismos pela incubação a temperatura adequada.
Mirastainer II	Coloração automática de esfregaços
Microscópio Ótico	Observação de esfregaços

Na Biologia Molecular, de momento, a única análise realizada é a determinação genética molecular *in vitro* de alelos HLA-B27, que se podem associar à doença de espondilite anquilosante. Como amostra é usado o sangue total colhido em EDTA. Para a execução deste teste genético são necessários alguns equipamentos, mencionados na Tabela iv.

Tabela iv: Equipamentos existentes no setor da Biologia Molecular do laboratório Beatriz Godinho.

Equipamento	Função
Termociclador	PCR (Amplificação do gene)
Câmara de hibridação	Microarray
Microarray scanner (EUROIMMUN)	Leitura de lâminas

A Autoimunidade é o setor onde se fazem os estudos serológicos de doenças autoimunes, pesquisando a presença ou ausência de autoanticorpos através de técnicas como a Imunofluorescência indireta, ELISA e Imunoblot. A amostra biológica utilizada é o soro, obtido após formação do coágulo e centrifugação a 4.000rpm durante 10 min. Na Tabela v são apresentados os vários equipamentos presentes neste setor.

Tabela v: Equipamentos existentes no setor da Autoimunidade do laboratório Beatriz Godinho.

Equipamento	Determinações/Funções
IF Sprinter (EUROIMMUN)	ANA
Analyzer I-2P (EUROIMMUN)	Ac. anti-dsDNA, ANA screen, Ac. anti-CCP, Ac. Anti-Transglutaminase IgA.
Auto-Lipa	Testes confirmatórios e de identificação de Autoanticorpos
Microscópio de Fluorescência - EUROStar III Plus (EUROIMMUN)	Observação de lâminas

Por fim, ao setor da Hematologia e Coagulação chegam amostras de sangue colhidas em tubos de EDTA e Citrato (anticoagulantes) para determinações hematológicas e de hemóstase. Ainda neste setor fazemos a observação microscópica da morfologia das células sanguíneas.

Este tema vai ser aprofundado mais à frente, no entanto posso referenciar desde já, os equipamentos disponíveis nesta área do laboratório (Tabela vi).

Tabela vi: Equipamentos existentes no setor da Hematologia/Coagulação do laboratório Beatriz Godinho.

Equipamento	Metodologia	Determinações
ADVIA® 2120 (Siemens)	Citometria de fluxo	Hemograma
Sysmex XE-5000™	Citometria de fluxo	Hemograma e Reticulócitos
ADAMS™ A1c HA-8180 T (ARKRAY)	HPLC de troca iónica	Eletroforese da Hemoglobina (HbA1, HbA1c, HBA2, HbF e variantes de Hb)
Premier Hb9210™ (A.MENARINI diagnostics)	HPLC por afinidade ao boronato	Quantificação da Hemoglobina glicada
Test I THL (ALIFAX)	Fotometria cinética capilar	Velocidade de sedimentação
Wadiana® (GRIFOLS)	Aglutinação e filtração através da coluna de gel	Tipagem de grupos sanguíneos
BCS® XP System (Siemens)	Testes de coagulação, cromogénicos, imunológicos e de aglutinação	Tempo de Protrombina, aPTT, Fibrinogénio, Tempo de Trombina, Antitrombina III e Anticoagulante lúpico.

O trabalho é iniciado depois de feita a triagem das amostras e avaliação do controlo de qualidade interno em todos os equipamentos. Dependendo da secção e tipo de análise, os resultados dados pelos aparelhos são enviados para um programa informático, o eDeia, através de ligações *on-line* e o Técnico Superior faz a interpretação dos mesmos, validando ou repetindo, se achar necessário. Na Hematologia se os valores do hemograma estiverem fora dos intervalos de referência ou se o equipamento der algum alerta, tem de ser feito um esfregaço de sangue e proceder à sua observação ao microscópio. Neste caso vai ser gravado o que o Técnico analisar na lâmina.

Cabe ao Especialista fazer a validação biopatológica, em que os resultados dos vários setores são analisados, tendo em conta as características do utente, o histórico, tratamentos a que foi alvo, patologias associadas e condições de colheita. Após todos estes passos é que é emitido um boletim de resultados que é entregue ao doente, salvo raras exceções em que o resultado é enviado diretamente para o médico prescritor da análise.

2.2 Centro Hospitalar de Leiria

O Centro Hospitalar de Leiria E.P.E (CHL) é composto por três unidades de saúde que surgiram da fusão realizada entre o Hospital de Santo André, E.P.E (HSA) situado em Leiria, o Hospital Distrital de Pombal (HDP) e o Hospital Bernardino Lopes de Oliveira, situado em Alcobaça. O Serviço de Patologia Clínica (SPC), apesar de englobar todos os hospitais, está centralizado no Hospital de Santo André em Leiria, daí ter sido o local onde decorreu o meu estágio.

O Diretor do serviço é o Dr. Ricardo Castro, médico Patologista Clínico. O SPC conta ainda com Técnicos Superiores de Laboratório, Técnicos de Análises Clínicas, Assistentes Operacionais e Assistentes Técnicos.

Na secretaria é feito o atendimento para colheitas principalmente durante a manhã, de acordo com a data e hora de marcação. São atribuídas prioridades aos utentes crianças, cadeira de rodas, insulino-dependentes e grávidas.

Os Técnicos de Análises Clínicas são responsáveis pela realização das colheitas de sangue, pedidas em Consulta Externa (ambulatório). Na urgência, as colheitas são feitas por Enfermeiros e podem chegar ao laboratório a qualquer hora, por isto o serviço funciona 24horas por dia para análises consideradas de caracter urgente.

Tal como no Laboratório Beatriz Godinho, existe um sistema de código de barras que é único para cada utente e que é colocado no tubo no ato da colheita ou no contentor que contenha outro produto biológico colhido pelo utente (urinas, fezes, expetoração), evitando assim troca de amostras.

Após a colheita, os produtos são distribuídos pelos diferentes setores de acordo com as análises pedidas. Existe um equipamento de pré-analítica, o AutoMate 1250 da Beckman Coulter, que faz a triagem e cria alíquotas quando necessário de várias amostras biológicas. Neste equipamento entram tubos de soro depois de centrifugados, urinas e tubos com sangue total, dando assim apoio ao setor da Hematologia, Bioquímica e Imunologia. Após leitura do código de barras, este aparelho separa os tubos em diferentes suportes de acordo com o equipamento em que vai ser feita a análise. Para além disto, no fim de todas as provas estarem executadas, ele tapa cada tubo com parafilme e arruma-os em suportes, cujo código e posição são conhecidos para facilitar a procura em eventuais repetições.

No laboratório de Hematologia faz-se os estudos das células sanguíneas, analisando vários fluídos biológicos, sendo que o sangue é o principal. Outros como líquido

cefalorraquidiano (LCR), líquidos pleurais (LP), lavados broncoalveolares (LBA) e medula óssea (MO) aparecem em menor quantidade. Na Tabela vii pode-se observar os diferentes equipamentos que existem nesta área do laboratório.

Tabela vii: Equipamentos existentes no setor da Hematologia do SPC do CHL.

Equipamento	Determinações
UniCel DxH800 + DxH Slidemaker Stainer (Beckman Coulter)	Hemograma + Reticulócitos + Esfregaço de sangue periférico + Coloração de Wright
ACL TOP 500 (Werfen)	Hemostase
VES- MATIC CUBE 30 (A.MENARINI diagnostics)	Velocidade de Sedimentação
Aerospray PRO 7151 (Wescor)	Citocentrífuga + Coloração de lâminas de vários fluídos biológicos
CAPILLARYS 2 FLEX PIERCING (Sebia)	Eletroforese de hemoglobinas + HbA1c
Navios EX Flow Cytometer (Beckman Coulter)	Imunofenotipagem de células

No setor da Bioquímica são processadas amostras de sangue total, soro, plasma e urina. Faz-se o doseamento de vários parâmetros para avaliar a função renal, cardíaca, hepática, pancreática, o equilíbrio eletrolítico, o metabolismo dos hidratos de carbono, o perfil lipídico, hormonas e concentração de fármacos. Para tal são usados vários equipamentos, que podem ser observados na Tabela viii.

Tabela viii: Equipamentos existentes no setor da Bioquímica do SPC do CHL.

Equipamento	Determinações
UniCel DxI 800 (Beckman Coulter)	Marcadores tumorais, hormonas (Quimioluminescência)
AU 5800 (Beckman Coulter)	Fármacos, metabolitos, iões, hidratos de carbono, lípidos e enzimas (Potenciometria, Turbidimetria e Espetrofotometria)
Aution MAX AX4030 (A.MENARINI diagnostics)	Análise química da urina (Espectrofotometria de reflectância)
sediMAX comTRUST (A.MENARINI diagnostics)	Sedimento urinário
GEM Premier 4000 (Werfen)	Gasometria (Espetrofotometria de absorção, potenciometria e amperometria)
AQT90 Flex (Radiometer)	NT-proBNP e procalcitonina (Imunoensaio)
COBAS e411 (Roche)	Marcadores tumorais e ACTH (Eletroquimioluminescência)

A Imunologia do SPC engloba a serologia infeciosa que se baseia na pesquisa de anticorpos presentes no soro do utente, que se formam na presença de um agente infecioso (bactérias, vírus ou parasitas), ditando assim a existência ou não de uma infeção. Nesta área laboratorial também é feito o estudo das proteínas no soro e urina, a pesquisa de autoanticorpos que poderão ser sugestivos de doença autoimune e ainda o despiste de alergias através da pesquisa de anticorpos IgE específicos de um alergénio, no soro do doente. Na Tabela ix podem ser observados os equipamentos que realizam estas análises.

Tabela ix: Equipamentos existentes no setor da Imunologia do SPC do CHL.

Equipamento	Determinações
LIAISON® XL (DiaSorin)	Determinação quantitativa de Ac contra Ag específicos (Quimioluminescência)
TRITURUS® System (GRIFOLS)	Determinação qualitativa e quantitativa de Ac contra Ag específicos (ELISA)
HYDRASYS 2 SCAN (Sebia)	Eletroforese das proteínas em gel de agarose
IF Sprinter (EUROIMMUN)	Preparação de lâminas para pesquisa de autoanticorpos (IFI)
Phadia® ImmunoCAP 250 (Thermo Fisher Scientific)	Alergénios (FEIA)

Ao laboratório de Microbiologia chegam vários tipos de amostras biológicas: urina, fezes, expetoração, sangue, LCR, lavados broncoalveolares, exsudados purulentos, exsudados ano-genitais, etc. Nestas amostras podem ser pedidos exames bacteriológicos, micobacteriológicos, micológicos, pesquisa de vírus e ainda a realização do Antibiograma em produtos que contenham bactérias significativas de uma infeção. Apesar deste setor funcionar maioritariamente com técnicas manuais, existem alguns equipamentos cruciais para a identificação de microrganismos, que estão descritos na Tabela x. Este tema será desenvolvido em pormenor mais adiante.

Tabela x: Equipamentos existentes no setor da Microbiologia do SPC do CHL.

Equipamento	Determinações/Funções
BACT/ALERT® 3D (bioMérieux)	Deteção microbiana (bactérias, micobactérias e fungos)
VITEK® 2 (bioMérieux)	Identificação bacteriana e Antibiogramas
GeneXpert® IV (Cepheid)	Deteta sequências específicas de ácidos nucleicos
Sofia® (QUIDEL)	Deteção qualitativa de antigénios de *Legionella pneumophila* e *Streptococcus pneumoniae* em amostras de urina
PREVI® Color Gram (bioMérieux)	Coloração automática de lâminas pela técnica de Gram
RAL STAINER (bioMérieux)	Coloração automática de lâminas pela técnica de Ziehl Neelsen
Estufas - Memmert™ e Heraeus	Favorece o crescimento de microrganismos pela incubação a temperatura adequada.
Câmara de fluxo laminar - Holten Laminar Air HBB 2448	Área de trabalho estéril (Protege o técnico e as amostras de possíveis contaminações)
Microscópio Ótico	Observação de esfregaços

O trabalho, em alguns setores, apenas é iniciado após realização e avaliação do controlo de qualidade interno que pode ser monitorizado no Modulab® (sistema para gestão global do Laboratório e suporte ao diagnóstico). Após a verificação dos resultados dos controlos internos, os Técnicos podem, então, colocar as amostras biológicas nos diversos equipamentos. Os resultados são enviados diretamente para o Modulab®, ou inseridos manualmente, quando se trata de técnicas manuais e depois validados por um Técnico Superior ou Médico Patologista. Cada área laboratorial faz a sua validação biopatológica tendo sempre em consideração os resultados das análises das restantes áreas, a idade, o género e o histórico de cada doente, assim como tratamentos a que foi alvo e patologias precedentes. Depois os resultados são enviados para o Médico prescritor da análise.

III. Gestão e Controlo de Qualidade

Os laboratórios de Analises Clínicas devem ter implementado um Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) que assegura uma boa qualidade do serviço prestado, tanto na fase pré-analítica, como na analítica e pós-analítica, no sentido da eliminação de erros e produção de resultados precisos e exatos.

Este sistema deve englobar uma gestão de qualidade interna e uma avaliação externa da qualidade. A qualidade é garantida pela "Certificação" ou "Acreditação" do laboratório. A "Acreditação" requer a evidência de competências técnicas, enquanto a "Certificação" apenas verifica se o laboratório tem as condições necessárias para a execução do ensaio analítico e não obriga à realização de uma avaliação externa da qualidade.

3.1 Laboratório Beatriz Godinho

O Laboratório Labeto em Leiria, possui desde 2003, a dupla certificação do Sistema de Gestão de Qualidade, de acordo com a norma NP EN ISO 9001 e as Normas para o Laboratório Clínico da Ordem dos Farmacêuticos, concedida pela APCER.

A fiabilidade dos resultados é assegurada pelo uso de controlos internos que permitem perceber o bom ou mau funcionamento dos equipamentos. No setor da Hematologia são diariamente medidas nos aparelhos amostras controlo, com valores conhecidos, para avaliar a precisão dos ensaios. São usados 3 níveis de controlo interno (alto, normal e baixo) que devem estar dentro dos valores de referência, no sentido do trabalho ser realizado com segurança. Quando algo está mal surgem alarmes e cabe ao Técnico avaliar a situação e decidir o que fazer, pode ser necessário uma calibração do equipamento, uma lavagem, ou o uso de um novo controlo, pois o utilizado pode estar degradado.

A exatidão dos resultados é comprovada pela participação em programas de avaliação externa da qualidade como: INSA, UK NEQAS e RIQAS. Estas entidades enviam amostras para o laboratório que as processam como se de uma amostra de um doente se tratasse, fazendo contagem de células sanguíneas, observação de um esfregaço de sangue periférico, pesquisa de parasitas no sangue, etc. Os resultados são então comparados entre os vários laboratórios participantes e cada recebe um relatório com a avaliação da sua competência.

3.2 Centro Hospitalar de Leiria

O CHL é acreditado pela agência de acreditação internacional em Saúde, a Joint Commission International (JCI). A JCI é a agência mais reputada e exigente mundialmente, que acredita instituições de saúde, através da verificação e avaliação de procedimentos e instalações, tendo como finalidade a prestação dos melhores cuidados ao doente. (CHL, 2017)

No setor da Microbiologia a qualidade interna é assegurada através da realização de alguns procedimentos, como por exemplo:

- Estirpes ATCC (American Type Culture Collection) – São estirpes padrão com resposta conhecida usadas para controlo das provas bioquímicas, colorações, morfologia e resposta a antibióticos;
- Temperaturas – Todos os dias são apontadas as temperaturas dos frigoríficos e estufas;
- Solução salina para realização de identificação microbiana e antibiogramas – Sempre que é utilizada esta solução, inocula-se em uma gota da mesma em gelose de sangue, e no dia seguinte observa-se se há crescimento na placa. Se houver crescimento significa que esta solução estava contaminada e a identificação microbiana e antibiograma devem ser confirmados;
- Placas de contacto – Estas placas são colocadas em contacto com as bancadas existentes nesta área do laboratório, com as batas, etc. e incubadas de forma a analisar o meio em que se trabalha, se há ou não suscetibilidade de contaminações.

Já a qualidade externa é avaliada através da participação nos programas de avaliação externa da qualidade, que são efetuados por entidades externas, como o UK NEQAS e permitem a comparabilidade de resultados com outros laboratórios que participem no mesmo programa. Isto permite avaliar se uma amostra tem o mesmo resultado quando trabalhada em vários laboratórios diferentes, que utilizam métodos e reagentes diferentes.

IV. Hematologia

A Hematologia é a área da Medicina que estuda as doenças associadas às células sanguíneas: eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Os eritrócitos são os responsáveis pelo transporte de oxigénio e dióxido de carbono, os leucócitos pela defesa do organismo contra a invasão por microrganismos indesejados (vírus, bactérias e fungos) e as plaquetas pela coagulação sanguínea. (Makris, Greaves e Gubert, 1998)

Diariamente são feitos, neste laboratório, aproximadamente 600 hemogramas, é a análise mais pedida pelos clínicos para este sector. Pude ainda acompanhar a realização de outras análises como o doseamento da HbA1c, a eletroforese de hemoglobinas, a velocidade de sedimentação, a tipagem de grupos sanguíneos e vários estudos de coagulação.

4.1 Hematopoiese

Nos primeiros meses de vida fetal, o saco vitelino, o baço e o fígado são os locais onde se dá a hematopoiese. Na infância e durante a vida adulta a única fonte de novas células sanguíneas é a medula óssea. (Hoffbrand e Moss, 2018)

A hematopoiese inicia-se com uma célula estaminal, que é definida como uma célula com grande potencial proliferativo, possibilitando a sua diferenciação em células progenitoras de todas as linhagens sanguíneas. Pode também autorrenovar-se permitindo a reconstituição da população hematopoiética a partir de uma única célula. (Grotto e Noronha, 2003)

As células progenitoras, a mieloide e a linfoide, vão depois dar origem às diferentes células maduras que são libertadas na corrente sanguínea, são elas: plaquetas, eritrócitos, granulócitos (neutrófilo, eosinófilo e basófilo), monócitos e linfócitos. (Hoffbrand e Moss, 2018) Todo este processo dá-se através de várias diferenciações que podem ser observadas na Figura 2.

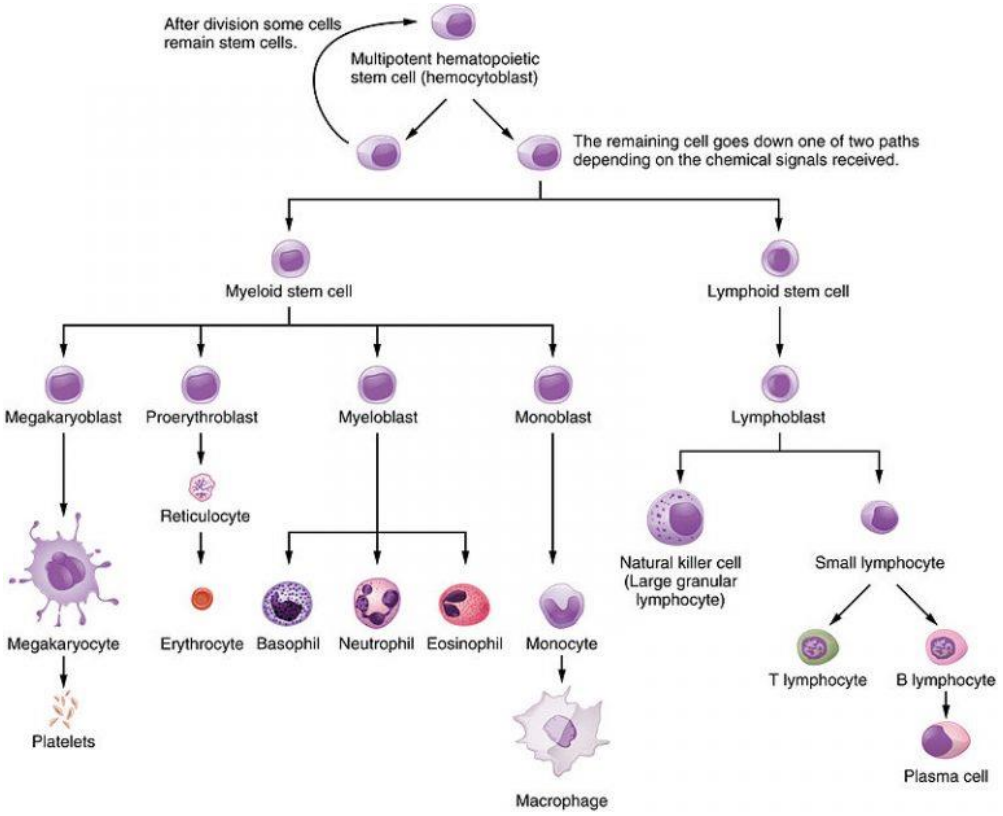

Figura 2: Esquema completo da hematopoiese.
Fonte: (Samanthi, 2017)

A proliferação e diferenciação das células progenitoras hematopoiéticas é controlada por fatores de crescimento hematopoiéticos. Estes fatores são glicoproteínas que atuam em baixas concentrações e são produzidos por vários tipos de células. Estes podem afetar também as funções de células maduras e prevenir a apoptose das células progenitoras. (Hoffbrand e Moss, 2012)

A megacariopoiese (formação de plaquetas) é estimulada pela trombopoietina, que é o fator de crescimento específico das Plaquetas. Estas têm um papel importante na coagulação do sangue.

A eritropoiese (formação de eritrócitos) é controlada pela eritropoietina, produzida no rim. Os eritrócitos têm como função o transporte de oxigénio e dióxido de carbono entre os vários tecidos do nosso organismo.

A mielopoiese (formação dos granulócitos – neutrófilos, eosinófilos e basófilos) dispõem de vários fatores de crescimento como: IL-3, IL-6 e GM-CSF. Os neutrófilos têm capacidade de fagocitose, constituindo a defesa primária contra bactérias e fungos. Os eosinófilos desempenham um papel importante na resposta a reações alérgicas e infeções parasitárias. Os basófilos libertam heparina e histamina durante o combate a agentes infeciosos e num processo alérgico. (Hoffbrand e Moss, 2012)

A formação dos monócitos e macrófagos depende do M-CSF. Os macrófagos podem ser encontrados nos tecidos e formam-se a partir dos monócitos que circulam no sangue. São responsáveis pela fagocitose de corpos estranhos, como detritos celulares, micróbios e células cancerígenas. (Hoffbrand e Moss, 2012)

A linfopoiese é induzida pela IL-2 e origina linfócitos B, linfócitos T e células *natural killer*. Os linfócitos B sofrem maturação na medula óssea e circulam no sangue até reconhecerem um antigénio, aí diferenciam-se em plasmócitos e iniciam a produção de anticorpos ou tornam-se células de memória. Os linfócitos T sofrem maturação no Timo e diferenciam-se em linfócitos T auxiliares capazes de libertar citocinas que induzem a resposta imune e linfócitos T citotóxicos que têm como principal função a eliminação de células infetadas. Os linfócitos B e T constituem a imunidade adquirida com reconhecimento específico de antigénios. As células NK reconhecem e destroem células anormais, infetadas ou cancerígenas, mas fazem parte da imunidade inata. (Hoffbrand e Moss, 2012)

4.2 Amostras

O sangue total é o produto biológico que chega a esta área do laboratório. Para as determinações da coagulação, o sangue é centrifugado para se obter plasma. O tubo (tampa roxa) que contém o anticoagulante K_3EDTA (EDTA tripotássico) é usado para a realização do hemograma, doseamento da HbA1c, eletroforese de hemoglobinas, velocidade de sedimentação e tipagem de grupos sanguíneos, usamos o sangue total. A função deste anticoagulante é impedir que ocorra a cascata da coagulação, através da fixação do cálcio plasmático, também protege as plaquetas durante o contacto do sangue com a superfície interna do tubo e preserva a morfologia celular. Porém, quando a quantidade de sangue, no tubo, é muito pequena, a elevada concentração de EDTA danifica as hemácias e quando é superior ao normal o sangue poderá coagular. (Almeida, Melo e Almeida, 2012) É por estas razões que é importante respeitar o traço do tubo que indica a quantidade correta de sangue para aquela concentração de anticoagulante.

O tubo (tampa azul) que contém Citrato de Sódio é usado para os estudos da coagulação onde usamos o plasma. Este é obtido após centrifugação a 3000rpm, durante 15min. Este anticoagulante age como um quelante do cálcio, como o EDTA, mas não preserva os eritrócitos, podendo ocorrer alterações na sua morfologia. (Almeida, Melo e Almeida,

2012) A proporção sangue/anticoagulante é deveras importante para se obterem resultados fidedignos.

4.3 Hemograma

O hemograma é uma das análises mais pedidas em todo o Mundo, dá-nos informações preciosas acerca do nosso estado de saúde. É utilizado no diagnóstico e monitorização de várias patologias, consiste em determinações qualitativas e quantitativas das células sanguíneas. Antigamente, as contagens de glóbulos e as demais determinações do hemograma eram feitas por técnicas manuais, lentas e trabalhosas, hoje em dia é feito em equipamentos automatizados, de uma forma rápida e eficaz, sendo os resultados mais fiáveis. No entanto, é útil conhecer os princípios das técnicas manuais, não só como método de referência, como também para serem realizadas quando os instrumentos automatizados dão resultados anómalos em certas amostras. (Bain, 2008)

4.3.1 Metodologia dos equipamentos

a. ADVIA® 2120 (Siemens)

Este equipamento utiliza a Dispersão de Luz para as contagens e medições hematológicas. Consegue identificar, transportar, homogeneizar e aspirar automaticamente as amostras de sangue total para um circuito de fluídos, onde existem cinco câmaras de reação:

1- Câmara de Reação de Hemoglobina (HGB);
2- Câmara de Reação de Basófilos (Baso);
3- Câmara de Reação de Peroxidase (Perox);
4- Câmara de Reação de Eritrócitos/Plaquetas (RBC/PLT);
5- Câmara de Reação de Reticulócitos (Retic).

É nestas câmaras que as amostras e os reagentes são misturados e ocorre uma reação citoquímica. As células, depois, ao passarem através de um feixe luminoso dispersam a luz que vai ser detetada por sensores fotóticos dispostos lateralmente ao feixe. Neste equipamento existem 2 tipos de feixe luminoso (Conjunto ótico *Perox* e Conjunto ótico *Laser*), enquanto o *Perox* é usado para os leucócitos o *Laser* é utilizado para os eritrócitos e plaquetas. Cada célula gera 2 sinais de dispersão: um sinal de ângulo alto (entre 5° e 15°) e um sinal de ângulo baixo (entre 2° e 3°). A dispersão de luz de ângulo alto relaciona-se com a densidade de DNA e

complexidade da lobulação da célula e a dispersão de luz de ângulo baixo diz respeito ao tamanho da célula ou do núcleo. O detetor é um fotodíodo que converte a luz em impulsos elétricos que podem ser acumulados e contados. O equipamento possui também um colorímetro de hemoglobina. (Siemens Health Care Diagnostics Inc., 2010)(Barone e Fernandes, [s.d.])(Bain, 2016)

Na **Câmara de Reação de Hemoglobina** é medida a HGB (Concentração Média de Hemoglobina), a MCH (Hemoglobina Corpuscular Média) e a MCHC (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média). (Siemens Health Care Diagnostics Inc., 2010)

A **Câmara de Reação de Basófilos** como o nome indica permite a contagem de basófilos e são concebidos gráficos, pelo sistema que podem ser interpretados.

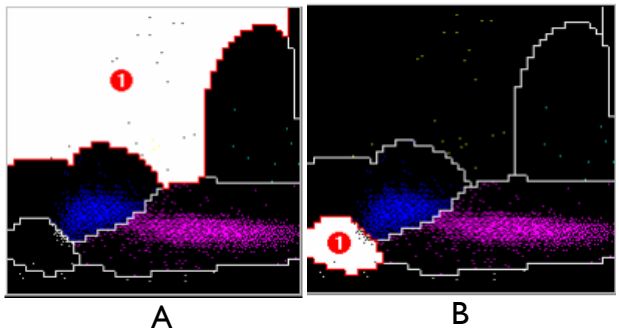

Figura 3: Citograma BASO.
A (1) – Número de basófilos.
B (1) – Número de ocorrências na área dos Blastos.
Fonte: (Siemens, 2010)

O citograma BASO é formado a partir dos dados de dispersão de luz de ângulo alto e baixo emparelhados, como se pode ver na Figura 3. A dispersão de luz de ângulo alto (configuração nuclear) é lida no eixo das abscisas (x) e a dispersão de luz de ângulo baixo (tamanho da célula) é lida no eixo das ordenadas (y). As áreas delimitadas na Figura 3 dizem respeito às diferentes populações leucocitárias. A azul estão representadas as células mononucleares e a roxo as células polimorfonucleares.

Esta Câmara de reação também deteta blastos, estes são detetados como uma população com densidade nuclear anormalmente baixa, como se pode observar na Figura 3B. Olhando para o eixo dos x, os blastos localizam-se muito à esquerda, isto significa que ainda têm poucos grânulos, ou seja, são células imaturas. (Siemens Health Care Diagnostics Inc., 2010)(Bain, 2016)

Na **Câmara de Reação de Peroxidase**, os neutrófilos, eosinófilos e monócitos são identificados com base na reação da peroxidase. Os sinais de dispersão de luz e absorção de luz são detetados e amplificados eletronicamente e depois de processados é apresentado um citograma PEROX, que permite a distinção dos diferentes leucócitos (Figura 4). No eixo das abscisas (x) é possível encontrar os valores de absorção correspondentes à atividade da peroxidase. No eixo das ordenadas (y) podem se observar os valores de dispersão de luz que

dizem respeito ao tamanho das células. A análise de cada área do gráfico também permite a contagem de células de cada população.

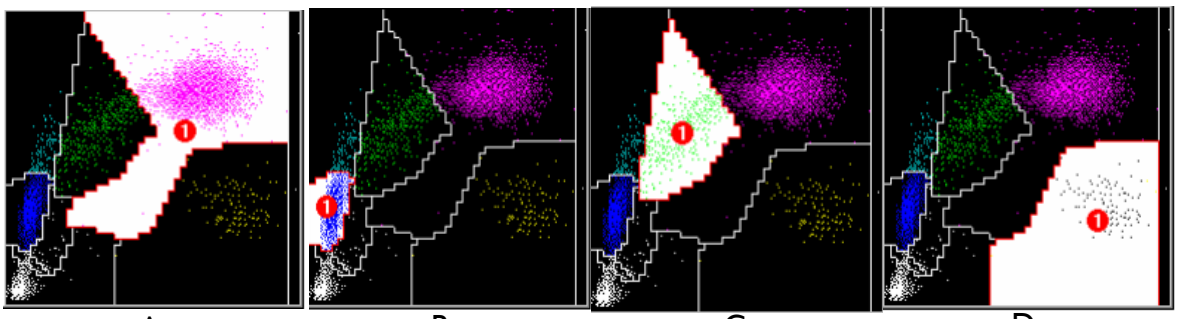

Figura 4: Citograma PEROX.
A (1) – Número de ocorrências na éreas dos Neutrófilos.
B (1) – Número de ocorrências na área dos Linfócitos.
C (1) – Número de ocorrências na área dos Monócitos.
D (1) – Número de ocorrências na área dos Eosinófilos.
Fonte: (Siemens, 2010)

Através da análise da Figura 4, conclui-se que os neutrófilos, monócitos e eosinófilos contém peroxidase, ao contrário dos linfócitos, que se encontram mais à esquerda no citograma. Os basófilos aqui já não são contabilizados, pois foram caracterizados na câmara de reação de basófilos. Os neutrófilos e os monócitos são os que apresentam um maior tamanho, sendo os neutrófilos os mais abundantes e os eosinófilos os menos abundantes.

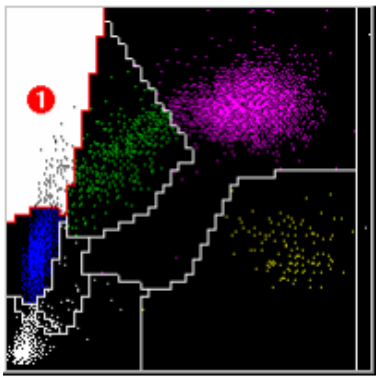

Figura 5: Número de ocorrências na área das LUC (1) do citograma PEROX.
Fonte: (Siemens, 2010)

Esta Câmara de reação também deteta LUC (Large Unstained Cells) que compreendem os linfócitos atípicos, blastos e outras células anormais. Estas células como o próprio nome indica são grandes e não coram, uma vez que não possuem peroxidase, por isso aparecem muito à esquerda no citograma (Figura 5), como os linfócitos.

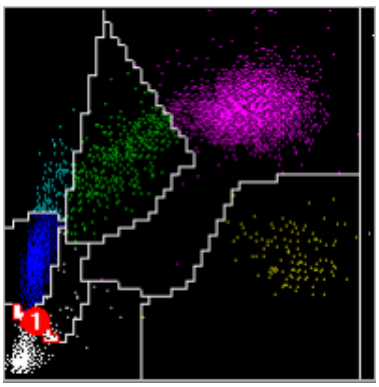

Figura 6: Número de ocorrências na área dos NRBC (1) do citograma PEROX.
Fonte: (Siemens, 2010)

Se estiverem presentes, NRBC (Nucleated Red Blood Cells) que são os eritroblastos, aparecem na área assinalada na Figura 6. Eles apresentam um tamanho pequeno e não coram na reação da peroxidase. O sistema usa dados da Câmara Perox e da Baso para a contagem dos NRBC e corrige o resultado dos leucócitos para os contabilizar. (Siemens Health Care Diagnostics Inc., 2010)(Bain, 2016)

A **Câmara de Reação de Eritrócitos/Plaquetas** determina o número de eritrócitos e plaquetas.

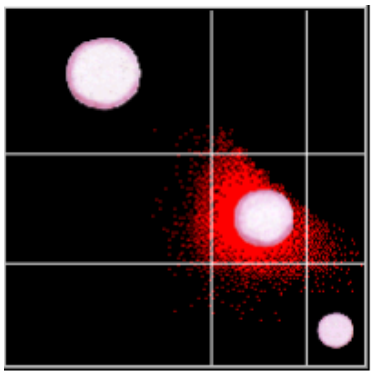

Figura 7: Citograma RBC V/HC (Volume/Concentra-ção de Hb).
Fonte: (Siemens, 2010)

O sistema gera um citograma do volume/concentração de Hb para os eritrócitos, onde a hemoglobina é representada no eixo das abscisas (x) e o volume das células no eixo das ordenadas (y). Como se pode ver na Figura 7, o eritrócito mais à esquerda é grande, mas possui pouca Hb, já o eritrócito mais à direita é pequeno e tem grande concentração de Hb.

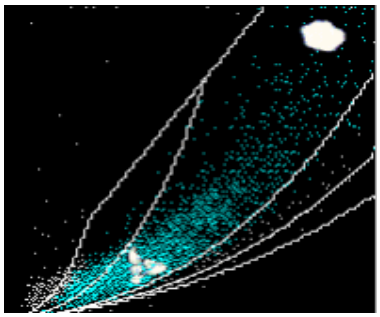

Figura 8: Citograma de Dispersão PLT.
Fonte: (Siemens, 2010)

É também criado um citograma de dispersão de plaquetas, onde a dispersão de luz de ângulo alto é representada no eixo das abscisas (x) e a de ângulo baixo no eixo das ordenadas (y). No eixo dos xx encontra-se, então o índice de refração e no eixo dos yy o volume das plaquetas. Como se pode ser na Figura 8, mais à esqueda do citograma estão plaquetas de tamanho normal e mais à direita as plaquetas gigantes.

Por este método é obtido também o MCV (Volume Corpuscular Médio), o RDW (Amplitude de Distribuição dos Eritrócitos), o HCT (Hematócrito) e o MPV (Volume Plaquetário Médio). (Siemens Health Care Diagnostics Inc., 2010)

No Laboratório Beatriz Godinho, os reticulócitos são determinados apenas no equipameto Sysmex XE-5000™, por isso apenas é referido esse método no Relatório.

As reações que ocorrem nas diferentes câmaras de reação estão explicadas em pormenor nos anexos.

b. Sysmex XE-5000™

Este equipamento utiliza 4 metodologias para analisar as diferentes células sanguíneas:

1- Citometria de Fluxo Fluorescente;
2- Método de RF-DC;
3- Corrente Contínua e Foco Hidrodinâmico;
4- Método SLS.

Este aparelho também identifica, transportar, homogeneiza e aspirar automaticamente as amostras de sangue total para um circuito de fluídos, onde existem seis canais diferentes:

- Canal HGB;
- Canal RBC/PLT;
- Canal 4DIFF;
- Canal WBC/BASO;
- Canal RET/PLT-O;
- Canal NRBC;
- Canal IMI.

1 – Citometria de Fluxo Fluorescente

A citometria é uma técnica utilizada para analisar as propriedades fisiológicas e químicas das células através de:

- Dispersão frontal de luz (forward scatter ou FSC);
- Dispersão lateral de luz – 90° (side scatter ou SSC);
- Fluorescência lateral (side fluorescence ou SFL).

A intensidade da dispersão frontal é proporcional ao tamanho células. A dispersão lateral corresponde à complexidade e granularidade das células. A fluorescência emitida indica a quantidade de DNA e RNA, ou seja, do tamanho do núcleo. (Barone e Fernandes, [s.d.])(Bruegel *et al.*, 2015)

Esta técnica é utilizada nos seguintes canais:

- Canal 4DIFF

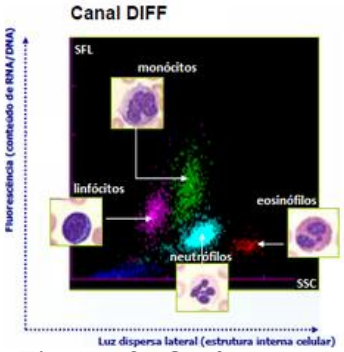

Figura 9: Gráfico de dispersão do Canal DIFF por citometria de fluxo fluorescente.
Fonte: (CENAPRO, 2015)

Os sinais de dispersão lateral (SSC) e fluorescência lateral (SFL) são analisados e apresentados num diagrama de dispersão como se pode ver na Figura 9. Este canal fornece a contagem dos linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos. (Bain, 2016)(Bruegel *et al.*, 2015)

- Canal WBC/BASO

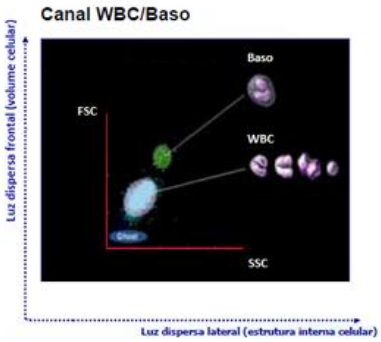

Figura 10: Gráfico de dispersão do Canal WBC/BASO por citometria de fluxo fluorescente.
Fonte: (CENAPRO, 2015)

Na Figura 10 observa-se o diagrama de dispersão de luz, onde os basófilos têm um tamanho (eixo y) superior aos restantes leucócitos, pois são os únicos que estão intactos, com citoplasma. Este canal fornece a contagem dos basófilos e do número total de leucócitos. (Bain, 2016)(Bruegel *et al.*, 2015)

- Canal RET/PLT-O

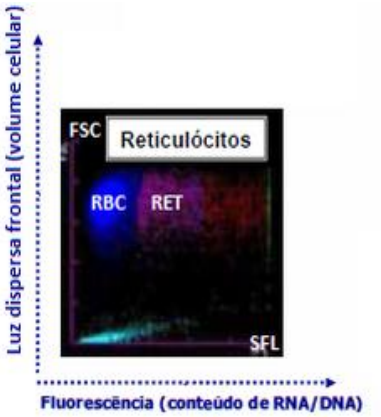

Figura 11: Gráfico de dispersão de RET, obtido por citometria de fluxo fluorescente.
Fonte: (CENAPRO, 2015)

É utilizado um marcador fluorescente nas células que evidencia os ácidos nucleicos dos leucócitos, eritrócitos nuceados, reticulócitos e plaquetas.

Como se pode ver na Figura 11, os eritrócitos maduros (RBC) estão mais à esqueda no gráfico, pois como já perderam o núcleo, já não têm ácidos nucleicos para corar, e por conseguinte não apresentam fluorescência. Os reticulócitos são células jovens que ainda não estão completamente maduras e por isso ainda apresentam material nuclear residual, o que permite que elas emitam alguma fluorescência.

Os eritrócitos nucleados e leucócitos têm o seu núcleo intacto, logo vão apresentar uma intensidade de fluorescência maior, sendo que os leucócitos ligam mais corante por terem uma grande quantidade de DNA no núcleo. As plaquetas coram pouco devido à pequena quantidade de RNA presente. Como apresentam um tamanho pequeno são as que se encontram mais em baixo (azul claro) no gráfico de dispersão representado na Figura 11.

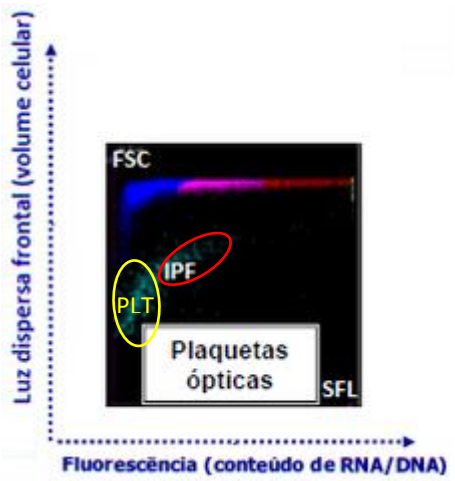

Figura 12: Gráfico de dispersão de PLT-O, obtido por citometria de fluxo fluorescente.
Fonte: (CENAPRO, 2015)

Neste canal também há medição de plaquetas imaturas (IPF), que ainda contêm retículo e por isso emitem fluorescência, como se pode ver na Figura 12 rodeadas a vermelho. Este parâmetro é usado para avaliar a trombocitopoiese, os seus níveis aumentam à medida que a produção de plaquetas na medula óssea aumenta. Para além da contagem de plaquetas por impedância no canal RBC/PLT, há também contagem por fluorescência óptica, representadas a amarelo, (Figura 12) o que garante uma precisão no resultado. (Bruegel *et al.*, 2015)

- <u>Canal NRBC</u>

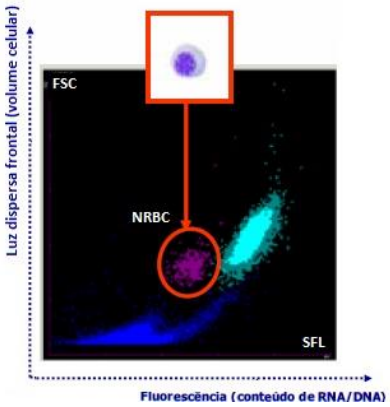

Figura 13: Gráfico de dispersão de NRBC, obtido por citometria de fluxo fluorescente.
Fonte: (CENAPRO, 2015)

Neste canal são medidos os eritroblastos (Nucleated Red Blood Cells-NRBC). Como se pode ver na Figura 13, os leucócitos (azul claro) são os que apresentam maior fluorescência, eixo dos xx, pois têm o DNA do núcleo e RNA do citoplasma corados. Já os eritroblastos, como o seu RNA (citoplasma) foi eliminado e a cromatina nuclear fica condensada, o corante não entra facilmente no núcleo, logo vão apresentar uma fluorescência menor. (Bain, 2016)(Bruegel *et al.*, 2015)

2 – Método de RF-DC

O Método de deteção por Radiofrequência/ Corrente Contínua deteta as células a partir de pulsos elétricos que estas geram quando imersas numa solução eletrolítica (meio condutor). (Barone e Fernandes, [s.d.])(Bruegel *et al.*, 2015)

- Canal IMI

Canal de Informação de Imaturidade das Células Mieloides.

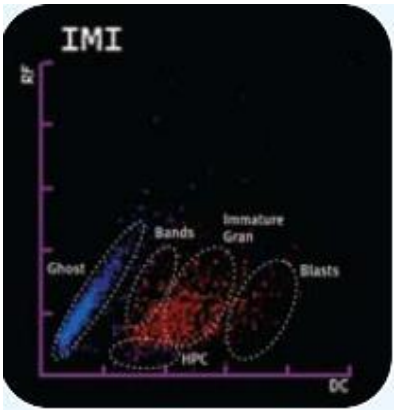

Figura 14: Gráfico de dispersão de IMI, obtido por método RF/DC.
Fonte: (Sysmex, 2010)

Na Figura 14 épossível observar as diferentes populações imaturas. O eixo dos xx corresponde ao tamanho das células, sendo os blastos os maiores. O eixo dos yy diz respeito à densidade do interior da célula.

Este equipamento oferece também uma contagem de células progenitoras hematopoiéticas (HPC), útil na determinação do momento ideal para a colheita de células-tronco no sangue periférico. (Bruegel *et al.*, 2015)

3 – Corrente Contínua e Foco Hidrodinâmico

Este método de deteção envolvendo Corrente Contínua é utilizado para contar eritrócitos e plaquetas.

- Canal RBC/PLT

Figura 15: Histograma da distribuição de volumes de RBC (eritrócitos) e PLT (plaquetas), obtido por corrente contínua.
Fonte: (CENAPRO, 2015)

Existe um detetor neste canal que conta e determina o tamanho dos eritrócitos e das plaquetas transformando os pulsos elétricos num histograma da distribuição de volumes (Figura 15).

4 – Método SLS

- Canal HGB

O Método de deteção SLS de hemoglobina utiliza lauril sulfato de sódio (SLS) sem cianeto. O reagente hemolisa os eritrócitos e leucócitos da amostra. Os eritrócitos libertam a hemoglobina, o grupo heme é oxidado e liga-se ao grupo hidrofílico do SLS, formando um complexo corado (SLS-HGB) que é analisado através de um método fotométrico.

Um LED emite luz monocromática com um comprimento de onde de 555nm e, ao passar pela mistura, a luz é absorvida pelos complexos SLS-HGB. A absorvância é medida por um fotossensor e é depois convertida em concentração de hemoglobina da amostra.

Os métodos de absorção fotométrica são normalmente influenciados pela turbidez da amostra, como a lipemia (muitos triglicerídeos no sangue) ou leucocitose (aumento de leucócitos no sangue). Utilizando o método SLS-HGB estas interferências podem ser minimizadas devido ao efeito do reagente. (Bruegel *et al.*, 2015)

As várias metodologias usadas pelo Sysmex XE-5000™ encontram-se explicadas em pormenor nos anexos.

4.3.2 Significado dos parâmetros avaliados

Após os esquipamentos terem feito o seu trabalho, cabe ao técnico a avaliação dos valores obtidos, fazer a correlação com o histórico, ter em conta a idade, género, etnia e medicação/patologia do utente. Estes equipamentos emitem alertas quando há algum parâmetro fora do normal, por exemplo uma contagem acima ou abaixo dos valores de referência, tamanhos incomuns ou a presença de células imaturas. Estes sinais despertam a atenção do técnico que, caso ache necessário, irá proceder à leitura do esfregaço sanguíneo, para ter a certeza que a avaliação do aparelho está correta.

Eritrograma

Avalia a massa eritroide circulante, sendo por isso utilizado para detetar os diferentes tipos de anemias. Inclui vários parâmetros que estão explícitos na Tabela xi. (Direção Geral da Saúde, 2013)

Tabela xi: Parâmetros avaliados no Eritrograma.

		Valor Referência
RBC ($x10^{12}$/L)	Quantidade total de **eritrócitos**. Diminuição da contagem = Eritrocitopenia, quando acompanhado de diminuição da HGB = Anemia Aumento da contagem = Eritrocitose, quando acompanhado do aumento da HGB e HCT = Poliglobulia	M: 4.31-6.40 F: 3.85-5.20
HGB (g/dL)	**Concentração de Hemoglobina** total presente no sangue.	M: 13.6-18.0 F: 11.5-16.0
HCT (%)	**Hematócrito**: É o volume ocupado pelos eritrócitos numa amostra de sangue. Correlaciona-se com a viscosidade sanguínea. Aumento da volémia = Hemodiluição Diminuição da volémia = Hemoconcentração	M: 39.8-52.0 F: 34.7-46.0
MCV (fL)	**Volume Corpuscular Médio**: Determina a média dos volumes de uma população de eritrócitos. É expresso em fentolitros (10^{-15}litros) Aumento do volume = Macrocitose Diminuição do volume = Microcitose	M/F: 80.0-97.0
MCH (pg)	**Hemoglobina Corpuscular Média**: Avalia a quantidade média de hemoglobina presente numa população de eritrócitos.	M/F: 26.0-34.0
MCHC (g/dL)	**Concentração Média de Hemoglobina Corpuscular**: Índice calculado a partir do valor da hemoglobina e hematócrito, que significa a concentração média de hemoglobina que está contida em cada eritrócito. Aumento da concentração = Hipercromia Diminuição da concentração = Hipocromia	M/F: 32.0-36.0
RDW (%)	**Dispersão do Volume Eritrocitário**: Corresponde à amplitude de distribuição do volume dos eritrócitos. É a expressão numérica da anisocitose (variação no tamanho). Inversamente proporcional à homogeneidade da população eritroide.	M/F: 11.5-15.0

Reticulócitos

São as células em maturação, depois do eritroblasto perder o núcleo. Portanto são eritrócitos imaturos que ainda contém retículo endoplasmático, ribossomas e mitocôndrias. Ainda têm a capacidade de produção de hemoglobina, apesar da ausência do núcleo, pois têm RNA mensageiro no citoplasma.

O tempo de vida dos eritrócitos é de 120 dias e a medula óssea produz novas células para substituir as que são perdidas todos os dias, esta renovação resulta numa percentagem de reticulócitos de cerca de 1% por dia em adultos. Os três primeiros dias de maturação dos reticulócitos ocorrem na medula óssea e no quarto dia são libertados na corrente sanguínea

para finalizarem este processo, onde perdem os organelos, adquirem um formato bicôncavo e a cor de eritrócito maduro. (Bruegel *et al.*, 2015)

A contagem de reticulócitos na circulação sanguínea avalia a taxa efetiva da produção de eritrócitos, permitindo o conhecimento acerca do funcionamento da medula óssea, sendo muito importante no diagnóstico de vários tipos de anemia e na confirmação da regeneração da medula após quimioterapia ou transplante. (Miyake, 2011)

Aumento de reticulócitos = Anemia hemolítica; Hemorragia; Resposta à terapia de um paciente com deficiência de vitamina B12, ácido fólico ou ferro; Administração de eritropoietina; Síndromes mieloproliferativos; Recuperação da MO após quimioterapia e radioterapia.

Diminuição de reticulócitos = Deficiência de vitamina B12, ferro ou ácido fólico; Supressão da MO por quimioterapia citotóxica ou outros medicamentos que afetem a MO; Anemia aplástica; Leucemia aguda; Síndromes mielodisplásicas. (Bain, 2008)

A contagem de Reticulócitos não é um procedimento de rotina e não faz parte dos parâmetros normais de um hemograma, só é realizado quando pedido pelo clínico. O resultado é expresso em percentagem: número de reticulócitos por 100 eritrócitos. O seu valor de referência é: 0.5-2.0%. (Bain, 2008)

Leucograma

Abrange a contagem global de leucócitos e a fórmula leucocitária que consiste na contagem diferencial de cada um dos leucócitos. Do ponto de vista morfológico dividem-se em dois grupos: polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e mononucleares (linfócitos e monócitos). Utilizado para detetar doenças infeciosas, inflamatórias, leucemias, linfomas e outras doenças hematológicas malignas. Inclui vários parâmetros que estão explícitos na Tabela xii. (Direção Geral da Saúde, 2013)

Tabela xii: Parâmetros avaliados no Leucograma.

		Valor Referência
WBC ($x10^9/L$)	Quantidade total de **leucócitos**. Aumento da contagem = Leucocitose Diminuição da contagem = Leucopenia	M/F: 4.0-10.0
NEU ($x10^9/L$)	Quantidade total de **neutrófilos**. Aumento do n° absoluto = Neutrofilia Diminuição do n° absoluto = Neutropenia	M/F: 1.5-8.0
LYM ($x10^9/L$)	Quantidade total de **linfócitos**. Aumento do n° absoluto = Linfocitose Diminuição do n° absoluto = Linfopenia	M/F: 0.8-4.0
MONO ($x10^9/L$)	Quantidade total de **monócitos**. Aumento do n° absoluto = Monocitose	M/F: 0.0-1.2
EOS ($x10^9/L$)	Quantidade total de **eosinófilos**. Aumento do n° absoluto = Eosinofilia	M/F: 0.0-0.3
BASO ($x10^9/L$)	Quantidade toral de **basófilos**. Aumento do n° absoluto = Basofilia	M/F: 0.0-0.3

Plaquetograma

Fornece informações sobre as plaquetas, que são fragmentos do citoplasma dos megacariócitos, com uma função importante na hemostase. As plaquetas circulam no sangue em média 10 dias e depois são removidas e destruídas no baço. Portanto quando há alterações neste órgão, pode haver um aumento ou diminuição de plaquetas. Os parâmetros que aqui são avaliados estão descritos na Tabela xiii. (Bain, 2008)(Direção Geral da Saúde, 2013)

Tabela xiii: Parâmetros avaliados no Plaquetograma.

		Valor Referência
PLT ($x10^9/L$)	Quantidade total de **plaquetas**. Aumento da contagem = Trombocitose Diminuição da contagem = Trombocitopenia	M/F: 140-440
MPV (fL)	**Volume Plaquetar Médio**: Determina a média dos volumes de uma população de plaquetas.	M/F: 6.5-12.4
PDW (%)	**Dispersão do Volume Plaquetar**: Traduz o índice de variação no tamanho das plaquetas.	M/F: 25.0-65.0

Muitas vezes há uma diminuição na contagem automática de Plaquetas que não é real, é chamada de pseudotrombocitopenia. Esta ocorre quando se formam agregados plaquetares no tubo EDTA e/ou outro anticoagulante, devido à ativação da glicoproteína GPII/III das plaquetas pelo autoanticorpo IgG (Figura 16). Só o exame microscópico do esfregaço sanguíneo permite o diagnóstico diferencial entre pseudotrombocitopenia e trombocitopenia real. De facto o EDTA é mais propício à agregação, no entanto esta também pode ocorrer no tubo Citrato. Se isto se observar a colheita de sangue deverá ser realizada junto ao contador automático, para que se proceda de imediato à contagem das plaquetas. (Titou, Jalal e Boui, 2017)

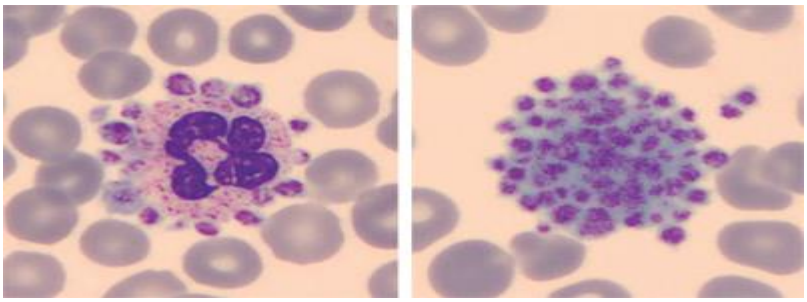

Figura 16: Satelitismo plaquetário, à esquerda. Plaquetas agragadas, à direita.
Fonte: (Mourad *et al.*, 2011)

O satelitismo é outro fenómeno que pode levar a uma contagem incorreta das plaquetas, em que há formação de "rosetas" em torno dos neutrófilos (Figura 16). Tal deve-se a uma ponte formada entre a glicoproteína GPII/III das plaquetas e o recetor FcγRIII dos neutrófilos, mediada por autoanticorpos IgG, induzidos pelo EDTA. Deve-se, portanto realizar a colheita para tubo de Citrato de Sódio. (Toishigawa *et al.*, 2018)(Mourad *et al.*, 2011)

4.3.3 Esfregaço de Sangue Periférico

Efetua-se sempre que for requisitado pelo clínico e/ou sempre que o equipamento emite alertas ou se o analista achar necessário, como dito anteriormente.

O esfregaço é feito com sangue venoso a partir do tubo de EDTA, porque este anticoagulante preserva a morfologia celular, como já foi referido anteriormente. São usadas lâminas de vidro limpas e desengorduradas e um distensor (lamela) que deve ser mais estreito que a lâmina.

A análise do esfregaço proporciona avaliação qualitativa de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, o estudo da morfologia celular e a verificação da presença ou não de células imaturas.

Para obter um bom esfregaço é usado uma gota de sangue, com um diâmetro de 1 a 2cm e o distensor deve estar inclinado com um ângulo de 45 graus em relação à lâmina (Figura 17). Primeiro fazer um ligeiro movimento para trás com o distensor até encostar à gota de sangue, deixando então, que a gota se difunda uniformemente na borda do distensor. Depois deslizar com a lamela (distensor) para a frente de uma maneira suave e uniforme, isto vai permitir que os elementos celulares adiram ao vidro e formem uma camada de células com três porções: fina (franja), média (corpo) e espessa (cabeça), como se pode ver na figura 18. Na franja, a disposição de eritrócitos e leucócitos é defeituosa, com células deformadas. No corpo encontram-se células com distribuição homogénea, perfeitas para análise. E na cabeça as células acumulam-se umas em cima das outras, o que vai dificultar a análise. (Naoum e Naoum, 2008) (Batista, 2012)

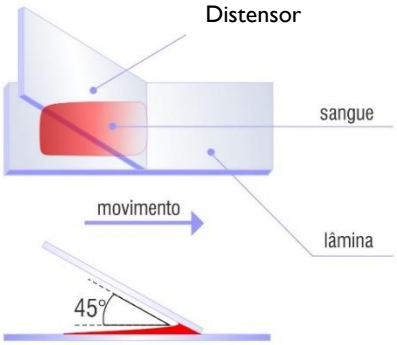

Figura 17: Modo correto para efetuar um esfregaço de sangue.
Fonte: (VidrariadeLaboratório, 2014)

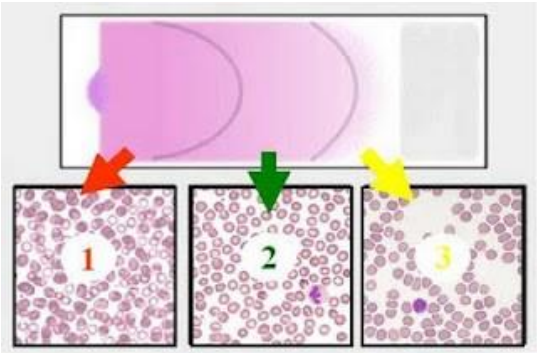

Figura 18: As diversas porções do esfregaço de sangue. 1) Cabeça; 2) Corpo; 3) Franja.
Fonte: (Batista, 2012)

Um mau esfregaço pode levar ao aparecimento de artefactos que podem prejudicar a observação microscópica.

Depois de seco, o esfregaço é fixado e corado manualmente. Para a coloração é utilizada a técnica de May-Grunwald-Giemsa, que contém metanol (fixa à lâmina), eosina (corante ácido) e azul de metileno (corante básico). A eosina confere cor laranja/avermelhado à hemoglobina, ao citoplasma do leucócitos e aos grânulos dos eosinófilos. O azul de metileno confere cor azul-violeta aos ácidos nucleicos (RNA e DNA), aos grânulos dos basófilos e fracamente aos grânulos dos neutrófilos. Com esta coloração é possível diferenciar as diferentes células sanguíneas. (Bain, 2016)

Seguidamente é feita a observação microscópica, primeiro com a objetiva de pequena ampliação (x40), onde se vê a qualidade do esfregaço e se escolhe o campo de acordo com o

que se pretende observar. De seguida passa-se para a objetiva de grande ampliação (x100), onde é necessário o uso de óleo. Com esta objetiva faz-se a contagem diferencial, observa-se a morfologia dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas e tem-se especial atenção à presença de células imaturas. A objetiva de 10x permite a observação de parasitas.

a. Morfologia dos eritrócitos e patologias associadas

Quando os eritrócitos são vistos ao microscópico observamos o tamanho, cor, forma, inclusões e presença de células imaturas da sua linhagem. Se houver alguma alteração é reportada ao clínico em observações, no resultado do eritrograma.

O eritrócito é uma célula com 8μm de diâmetro em forma de disco bicôncavo flexível. A sua cor pode mudar dependendo da quantidade de hemoglobina A sua membrana compreende uma bicamada lipídica, proteínas estruturais da membrana e um esqueleto da membrana. Defeitos nas proteínas causam algumas anomalias na forma da membrana dos eritrócitos. (Hoffbrand e Moss, 2018)

Tamanho

Num esfregaço podem ser encontrados eritrócitos macrócitos (grandes), micrócitos (pequenos), ou ambos. Quando se encontram eritrócitos de tamanhos variados diz-se anisocitose e deve ser escrito qual o tamanho predominante. Na Tabela xiv é possível observar as diferentes patologias associadas ao tamanho dos eritrócitos. (Naoum e Naoum, 2008)

Tabela xiv: Exemplos de Patologias que levam ao aparecimento de Macrócitos e Micrócitos.

Tamanho	Patologia
Macrócito	Deficiência de vit. B12; Deficiência de ácido fólico; Mieloma múltiplo; Anemia aplástica.
Micrócito	Talassemias; Anemia sideroblástica; Deficiência de ferro; Síndrome mielodisplásica.

Cor

As alterações referentes ao conteúdo de hemoglobina nos eritrócitos podem ser: hipocromia (pouco corados), hipercromia (muito corados), anisocromia (presença de eritrócitos normocrómicos e hipocrómicos/hipercrómicos) ou policromatofilia (azul-violeta).

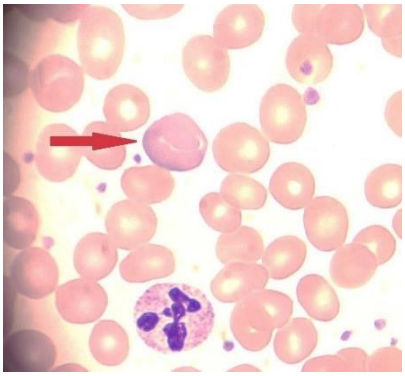

Figura 19: Eritrócito policromatófilo. (Fonte: Sector da Hematologia do Laboratório Beatriz Godinho.)

Os eritrócitos policromatófilos (Figura 19) captam a eosina pela hemoglobina e o azul de metileno pelo RNA ribossómico, ou seja estes eritrócitos são imaturos, com características de reticulócitos em transformação para eritrócitos. A sua presença indica eritropoiese em atividade aumentada. Na Tabela xv é possível observar as diferentes causas que levam à alteração da cor dos eritrócitos. (Naoum e Naoum, 2008)

Tabela xv: Exemplos de Patologias/Causas que alteram a cor dos eritrócitos.

Cor	Patologia/Causa
Hipocromia	Anemia ferropénica; Talassémias.
Hipercromia	Esferocitose; Eliptocitose.
Anisocromia	Resposta a tratamento de anemia.
Policromatofilia	Stress hematopoiético.

Forma

A alteração da forma dos eritrócitos é chamada de poiquilocitose. Na Figura 20 podem-se analisar as diferentes formas que os eritrócitos adquirem e as respetivas causas.

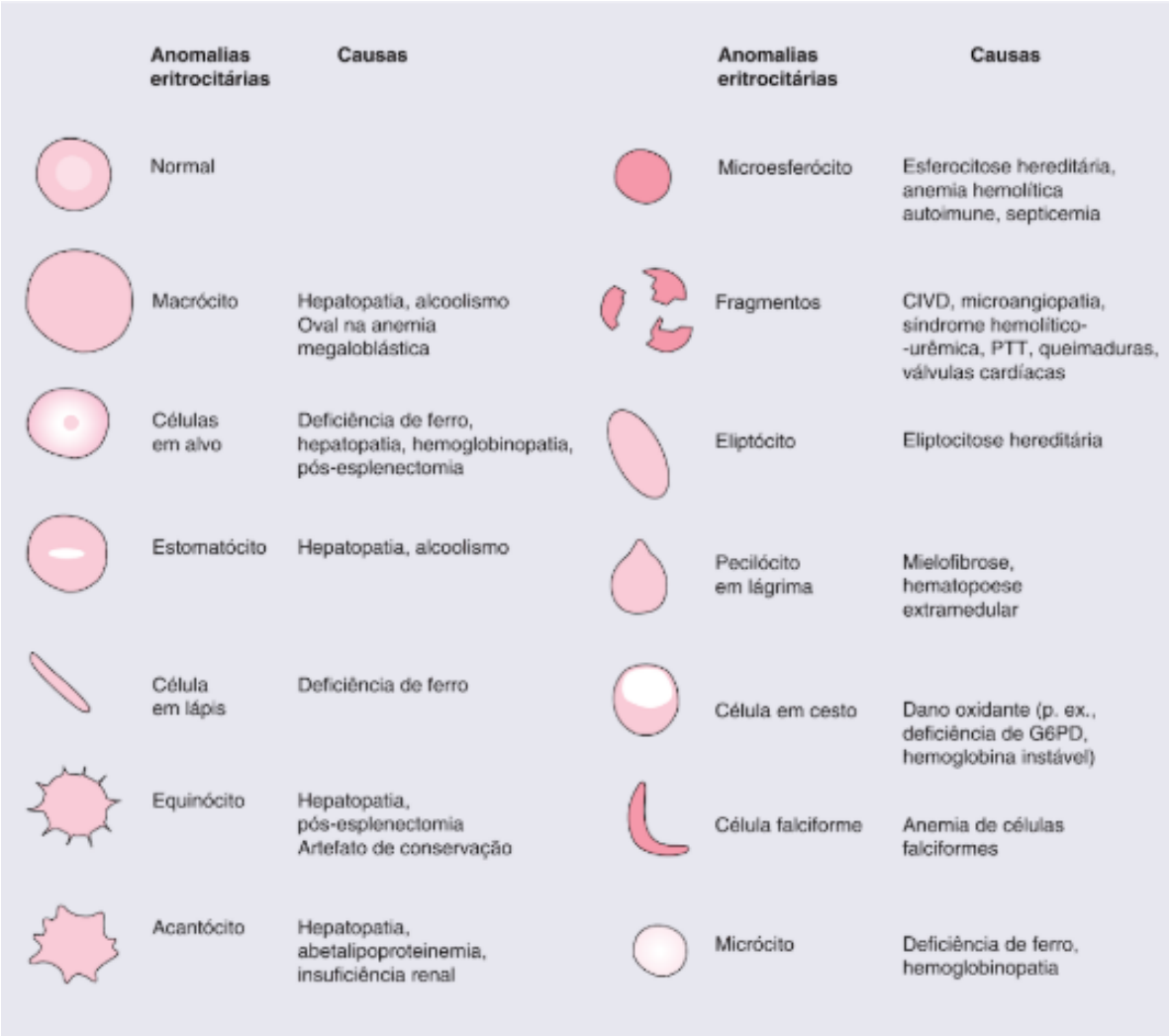

Figura 20: Formas e tamanhos que os eritrócitos podem adquirir e respetivas causas. CIVD- Coagulação intravascular disseminada; G6PD- Glicose-6-fosfato-desidrogenase; PTT- Púrpura trombocitopénica trombótica.
Fonte: (Hoffbrand e Moss, 2018)

Inclusões

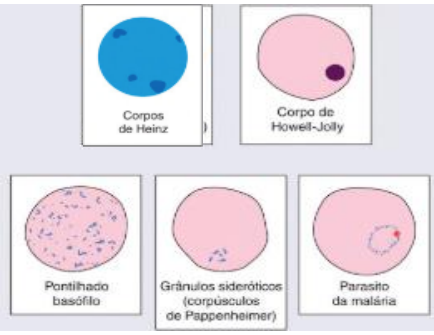

Figura 21: Inclusões eritrocíticas.
Fonte: (Hoffbrand e Moss, 2018)

As inclusões nos eritrócitos são decorrentes da maturação anormal das células, intoxicações que afetam a síntese da hemoglobina, alterações genéticas da síntese de hemoglobina, desnaturação da hemoglobina, agregados de ferritina e presença de microrganismos. Podem ser vistas na Figura 21. (Naoum e Naoum, 2008)

Na Tabela xvi estão descritas as várias inclusões, o seu significado e as principais causas.

Tabela xvi: Exemplos de Patologias/Causas que levam ao aparecimento de corpos de inclusão nos eritrócitos.

Inclusão	Característica/Significado	Patologia/Causa
Corpos de Heinz	Precipitados de hemoglobinas desnaturadas.	Hb instáveis; Meta-hemoglobina.
Corpos de Howell-Jolly	Corpúsculos remanescentes de DNA (roxo).	Anemia; Esplenectomia.
Pontilhado Basófilo	Grânulos azuis distribuídos irregularmente. RNA desnaturado.	Intoxicação por chumbo; Talassemia beta menor.
Corpos de Pappenheimaer	Agregados de ferro (azul).	Talassemia maior; Anemia sideroblástica.
Microrganismos	Parasitas, bactérias.	Malária; Septicémia.

Células imaturas

Na observação do esfregaço de sangue periférico também podem aparecer células imaturas, como o Eritroblasto, pertencente à linhagem eritroide. Morfologicamente é uma célula circular, o seu núcleo ocupa 2/3 do volume total e o citoplasma é caracterizado por basofilia (cora com o azul de metileno- corante básico), visto ainda ter uma grande quantidade de RNA (Figura 22). Tem uma média de vida de 40 horas e é ele que dá início à síntese de hemoglobina. (Naoum e Naoum, 2008)

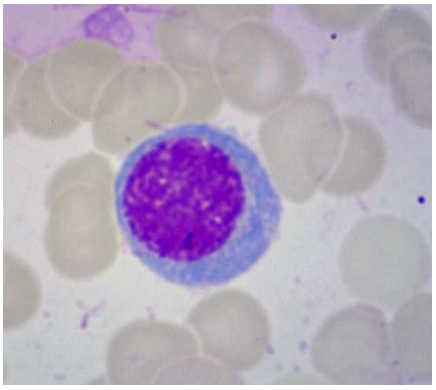

Figura 22: Eritroblasto basófilo.
Fonte: (UFG, 2014)

A presença de Eritroblastos no sangue não é normal, exceto em recém-nascidos prematuros, e pode indicar a presença de algumas patologias, como Eritropoiese hiperplásica, Anemia ferropénica e ainda ser causa de envenenamento por arsênio ou chumbo. (Bain, 2008)

b. Morfologia e alterações quantitativas dos leucócitos e patologias associadas

A observação de leucócitos ao microscópico inclui a observação da morfologia, de alterações no estado de maturação e de alterações quantitativas, através da contagem diferencial, que pode ser feita manualmente quando o equipamento não faz uma correta contagem. As alterações observadas são descritas no boletim de resultados em observações junto ao leucograma, para o conhecimento do clínico.

Os leucócitos são classificados em polimorfonucleares ou granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e mononucleares (linfócitos e monocitos). Os polimorfonucleares têm núcleos lobulados, que são muito variáveis na forma e grânulos citoplasmáticos proeminentes. Os mononucleares também podem ter grânulos, mas são pouco percetíveis e em baixo número. (Bain, 2008)

Os percursores destas células podem aparecer na corrente sanguínea em condições patológicas ou em condições fisiológicas, como a gravidez e durante o período neonatal. Como nem sempre são corretamente identificados pelo equipamento, uma observação ao microscópico de um esfregaço é a melhor maneira de os detetar.

<u>Alteração quantitativa</u>

Sempre que há leucocitose ou leucopenia é necessário verificar qual das populações está afetada, se é uma alteração global ou se existem células imaturas da linhagem mieloide e linfoide no sangue periférico que estão a contribuir para o aumento, dependendo disto as causas podem ser inúmeras.

Na Tabela xvii é possível observar as várias populações de leucócitos, suas alterações quantitativas e algumas causas. (Bain, 2008)

Tabela xvii: Exemplos de Patologias/Causas que levam à alteração quantitativa dos vários tipos de leucócitos.

Tipo de Leucócito	Contagem	Patologia/Causa
Neutrófilo	Neutrofilia (Aumento)	Infeções (por bactérias, vírus, fungos ou parasitas); LMC.
	Neutropenia (Diminuição)	Infeções (por bactérias, vírus, fungos ou parasitas); Anemia aplástica; Granulopoiese ineficaz.
Eosinófilo	Eosinofilia (Aumento)	Doença alérgica; Infeção parasitária; LMC.
	Eosinopenia (Diminuição)	Infeções agudas; Síndrome de Cushing; Administração de fámacos (adrenalina).
Basófilo	Basofilia (Aumento)	LMC; Policitemia Vera; Reações de hipersensibilidade.
	Basopenia (Diminuição)	Infeções; Hipertiroidismo.
Linfócito	Linfocitose (Aumento)	Infeções virais; Esplenectomia; LLC; Linfomas.
	Linfopenia (Diminuição)	Linfoma de Hodgkin; Terapia com eritropoietina; Anemia Aplástica; Síndromes Mielodisplácicas.
Monócito	Monocitose (Aumento)	LMA; LMC; LMMC.
	Monocitopenia (Diminuição)	Administração de corticosteroides; Infeções agudas.

Presença de outras células

Durante o estágio pude observar a presença de células da linhagem mieloide e linfoide, no esfregaço de sangue periférico, que podem indicar a existência de alguma patologia.

- **Plasmócitos**

São células que circulam nos tecidos, mas em estado de doença podem estar presentes no sangue periférico, como é o caso do Mieloma Múltiplo. Em indivíduos saudáveis os plasmócitos não aparecem no sangue periférico.

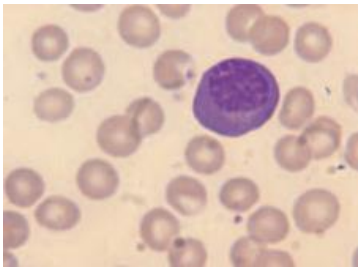

Figura 23: Plasmócito no sangue periférico.
Fonte: (Bain, 2008)

Também podem aparecer em fenómenos reativos, como uma infeção, inflamação e várias neoplasias. O seu aspeto pode ser examinado na Figura 23. (Bain, 2008)

• **Linfócito atípico**

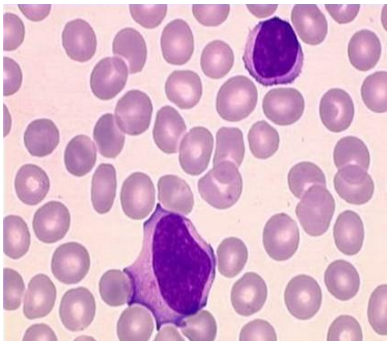

Figura 24: Linfócito atípico no sangue periférico.
Fonte: (Bain, 2008)

Apresentam citoplasma mais basofílico que o linfócito normal, têm um núcleo irregular que parece "abraçar os eritrócitos" e tem um tamanho maior (Figura 24). Aparecem em grande número na Mononucleose infeciosa. (Bain, 2008)

• **Granulócitos imaturos**

Os granulócitos são produzidos na medula óssea a partir de Mieloblastos, e passam por várias diferenciações (Promielócitos, Mielócitos, Metamielócitos e Bastonetes) até ficarem maduros, como se vê na Figura 25. Ocasionalmente, estes precursores são vistos no sangue, havendo o chamado *left shift*. A sua presença pode indicar LMA, Anemia Megaloblástica ou LMC. (Bain, 2008)

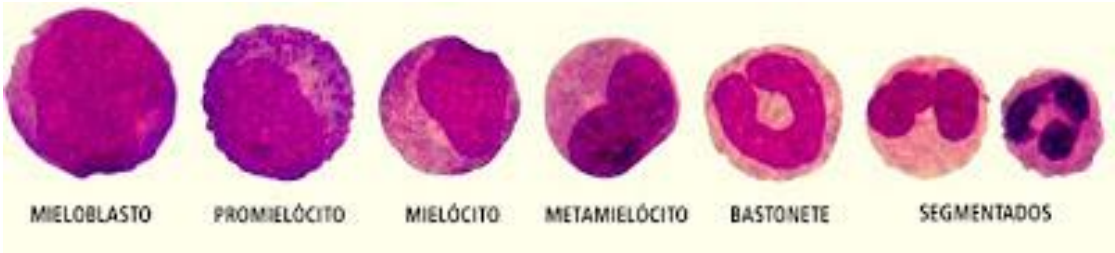

Figura 25: Evolução celular na granulopoiese.
Fonte: (CadernodeFarmácia, 2012)

c. Morfologia e alterações quantitativas das plaquetas e patologias associadas

Quando as plaquetas são observadas ao microscópio, a sua morfologia pode ser analisada, o seu tamanho e se há ou não agregados, o que vai confirmar a contagem feita pelos equipamentos.

Os megacariócitos (células da medula óssea que dão origem às plaquetas) podem ser observados no sangue de pessoas saudáveis, em baixo número. Em certos estados de doença aparecem em quantidades elevadas.

As plaquetas medem 1.5 a 3μm de diâmetro, têm grânulos azurófilos (α) que podem estar dispersos por todo o citoplasma ou concentrados no centro. (Bain, 2008)

Tamanho

O tamanho das plaquetas pode ser avaliado comparando o seu diâmetro com os eritrócitos. As plaquetas gigantes podem ser consequência da TTP, LMC, Sindromes Mielodisplásicas.

Morfologia

As plaquetas com deficiência de grânulos α têm cor cinza e pode ser consequência da Síndrome de Plaquetas Cinzentas ou devido à formação defeituosa por megacariócitos displásicos.

Megacariócitos

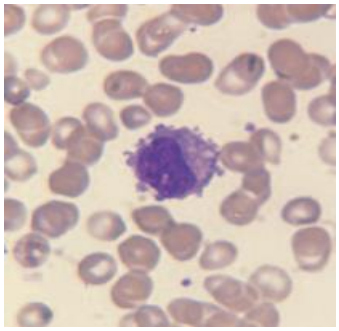

Figura 26: Megacariócito de um paciente com Mielofibrose idiopática.
Fonte: (Bain, 2008)

Os megacariócitos podem aparecer como consequência de Neoplasias Hematológicas (ex: Mielofibrose idiopática), LMC. Têm núcleo redondo ou ligeiramente irregular com cromatina densa e um citoplasma pequeno fracamente basofílico (Figura 26). (Bain, 2008)

Alteração quantitativa

Na contagem de plaquetas pode haver aumentou ou diminuição do seu número quando comparadas com os valores de referência, tais alterações podem dever-se a estados de doença que estão explícitos na Tabela xviii. (Bain, 2008)

Tabela xviii: Exemplos de Patologias/Causas que levam à alteração quantitativa das plaquetas.

Contagem	Patologia/Causa
Trombocitose (Aumento)	Trombocitemia essencial; LMC; Sindromes mielodisplásicas; Infeções; Hemorragias; Esplenectomia.
Trombocitopenia (Diminuição)	Falha na produção: Hipoplasia megacariocítica; Síndromes mielodisplásicas; Infeções por alguns vírus. Aumento da destruição/consumo: Púrpura trombocitopénica imune; Cocaína; Coagulação intravascular disseminada; Infeções.

4.3.4 Anemia

É definida como a diminuição da concentração de hemoglobina no sangue abaixo dos valores de referência (Tabela xi), com variações segundo a idade, sexo e altitude, tendo como resultado uma diminuição da capacidade de transporte de oxigénio pelo sangue para os tecidos. A classificação dos vários tipos de anemia baseia-se em índices eritrocitários (MCV e MCH) e divide-as em microcíticas, normocíticas e macrocíticas (Tabela xix). (Hoffbrand e Moss, 2012)

Tabela xix: Classificação dos vários tipos de anemia.

Microcítica e Hipocrômica	Normocítica e Normocrômica	Macrocítica
MCV <80fL MCH <26pg	MCV 80-95fL MCH ≥27pg	MCV >95fL
Deficiência de ferro	Anemia hemolítica	Megaloblástica: deficiências de vitamina B12 e folato
Talassemias	Anemia de doença crônica	Não Megaloblástica: abuso de álcool, anemia plástica, etc.
Anemia de doença crônica	Anemia pós-hemorrágica aguda	
Intoxicação por chumbo	Nefropatias	
Anemia sideroblástica	Insuficiência da medula óssea	

4.3.5 Leucemia

É caracterizada pela proliferação neoplásica e acumulação de células hematopoéticas imaturas na medula óssea e sangue periférico. É classificada como linfocítica ou mieloide, de acordo com o tipo de célula que se multiplica anormalmente (Tabela xx). Pode ser aguda, quando há uma progressão rápida da doença com predomínio de células altamente imaturas (blastos) ou cronica, se a doença for de progressão lenta com números elevados de células maduras. (Bagness, 1993)

Tabela xx: Classificação das Leucemias.

		Diagnóstico
Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA)	Células mieloides imaturas (Mieloblastos)	>20% Blastos na Medula óssea e no sangue periférico Anemia e trombocitopenia (Falência Medular)
Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)	Linfócitos B ou T imaturos (Linfoblastos)	
Leucemia Mielóide Crónica (LMC)	Diferenciação de Granulócitos anormais que executam funções essenciais 95% cromossoma Philadélfia	Aumento do número de células maduras no sangue
Leucemia Linfocítica Crónica (LLC)	95% Linfócitos B 5% Linfócitos T	

Embora as causas da leucemia não sejam totalmente compreendidas, sabe-se que alguns fatores aumentam o risco de desenvolver esta doença: radiação ionizante, fatores genéticos, carcinogénicos químicos, patologias ou condições adquiridas e viroses oncogénicas. (Bagness, 1993)

Para o diagnóstico várias técnicas são utilizadas: citologia, citoquímica, imunofenotipagem, citogenética e PCR.

4.4 Hemoglobina

A hemoglobina é o principal componente dos eritrócitos e é sintetizada maioritariamente no Eritroblasto, na medula óssea. É uma proteína conjugada com um peso molecular de aproximadamente 64.500Da, na sua estrutura tem uma parte proteica (Globina) e uma parte não proteica (Grupo prostético- heme).

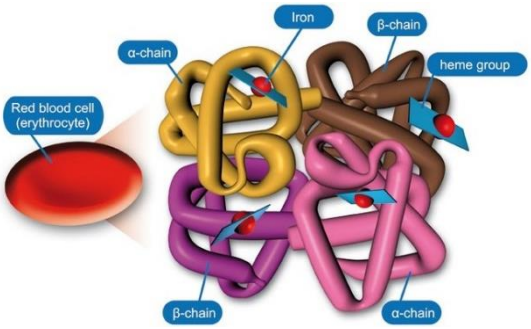

Figura 27: Estrutura da hemoglobina.
Fonte: (Magalhães, 2011)

A parte proteica engloba 2 pares de cadeias polipeptídicas (α, β, γ e/ou δ) ligadas por ligações não covalentes. Cada cadeia está ligada a um grupo heme covalentemente, como se observa na Figura 27. O grupo heme é constituído por protoporfirina (parta orgânica) e por um átomo de Ferro, no estado ferroso (+2), para se poder ligar ao oxigénio.

Existem então 3 tipos de hemoglobinas que se distinguem pelas variações das globinas que as constituem:

A – α_2 β_2 (~97%);

A_2 – α_2 δ_2 (2-3%);

F – α_2 γ_2 (<1%), encontrada no feto e no recém-nascido .

A cadeia α tem 141 aminoácidos, enquanto as cadeias β, γ δ têm 146. Alterações nas sequências dos resíduos de aminoácidos das cadeias de globina podem resultar em hemoglobinopatias e reduções na produção das cadeias de globina provoca talassemias. (Burtis e Bruns, 2001)

4.4.1 Hemoglobina Glicada

O doseamento da HbA1c, no laboratório Beatriz Godinho, é da responsabilidade do setor da Hematologia, uma vez que a amostra utilizada também é sangue total anticoagulado com EDTA, como nos hemogramas.

A HbA1c resulta de uma reação não enzimática, lenta e irreversível (glicação), entre a glicose que circula no sangue e os grupos aminas livres existentes na hemoglobina dos eritrócitos. Assim quanto mais alta for a concentração de glicose livre no sangue, maiores os valores da HbA1c. A hemoglobina glicada é um bom indicador da glicémia nos últimos 120 dias, pois este é o tempo médio de vida dos eritrócitos. (DGS, 2012)

A HbA1c é determinada, por rotina, em todas as pessoas com diabetes *mellitus*, para avaliar o grau de controlo glicémico, de acordo com as normas da DGS. Pode também ser usada como diagnóstico de diabetes, HbA1c ≥6.5%, que deve ser confirmado através da

repetição do teste numa colheita distinta. Deve-se ter em conta que o seu valor pode ser alterado por outros fatores além da glicose, como por exemplo hemoglobinopatias e situações de elevado *turnover* eritrocitário. (DGS, 2012)

Os resultados de HbA1c devem ser apresentados em mmol/mol de Hb, unidades indicadas pela IFCC e em percentagem (NGSP/DCCT). Também é recomendado o valor da glicémia média estimada (GME), obtida por cálculo a partir do valor da HbA1c em percentagem. (DGS, 2012)

Sistema Convencional: GME em mg/dL = 28.7 x HbA1c (%) – 46.7

Sistema Internacional (SI): GME em mmol/L = 1.59 x HbA1c (%) – 2.59

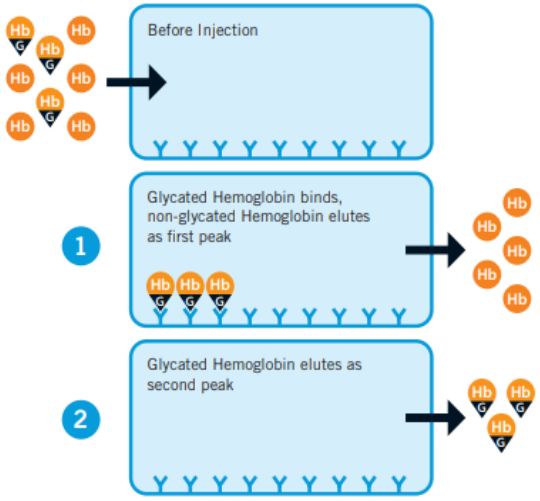

Figura 28: Esquema da técnica de HPLC por afinidade ao boronato.
Fonte: (Your Diagnostics Prtener, 2015)

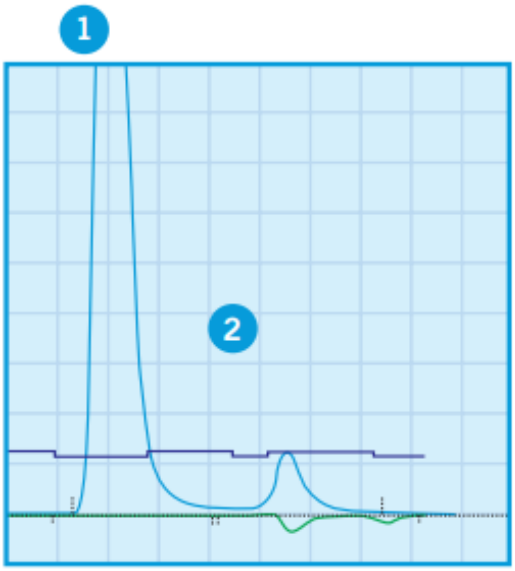

Figura 29: Cromatograma do Premier Hb9210™.
Fonte: (Your Diagnostics Prtener, 2015)

O equipamento usado para a deteção da hemoglobina glicada é o Premier Hb9210™ (A.MENARINI diagnostics), que utiliza a técnica de HPLC por afinidade ao boronato (Figura 28).

Este método elimina qualquer interferência de variantes de hemoglobina. Este método consiste na reação específica entre a HbA1c e o boronato. Como o boronato está na coluna a Hemoglobina glicada vai ligar-se, enquanto que a hemoglobina não glicada é eluída, como se pode ver na Figura 28. A HbA1c como tem maior afinidade com o boronato move-se mais lentamente na coluna, logo só é eluída um tempo depois.

Ao saírem da coluna, as Hbs passam por um detetor que emite um sinal elétrico que é registado, constituindo um cromatograma (Figura 29). Neste só aparecem 2 picos, o 1° correspondente à Hb que eluiu

primeiro (Hb não glicada) e o 2° correspondente à Hb1c. (John *et al.*, 2015)(Your Diagnostics Partner, 2015)

4.4.2 Eletroforese da Hemoglobina

A eletroforese permite a separação das várias frações da hemoglobina e as suas variantes, o que possibilita o estudo de anomalias qualitativas (alteração estrutural das cadeias globinicas) e quantitativas (diminuição ou ausência de síntese de uma ou mais cadeias de globina). (INSA, 2009)

O equipamento usado é o ADAMS™ A1c HA-8180 T (ARKRAY), este usa a tecnologia de HPLC de troca iónica para analisar HbA1c, HbA2, HbF com separação clara das hemoglobinas HbS, HbC, HbD, HbE, HbH, Hb Barts e detetar outras variantes da hemoglobina. (Urrechaga, 2018)

Esta técnica cromatográfica separa as hemoglobinas com base na sua carga total e no seu comportamento ácido-base, uma vez que utiliza uma coluna analítica com uma resina de troca iónica e um gradiente de eluição de fosfato tamponado com uma força iónica crescente. As frações de Hb são detetadas por um fotodíodo num comprimento de onda duplo (420-500nm) e é feita a quantificação das frações normais e anómalas da Hb. (INSA, 2009) (Urrechaga, 2018)

a. Anomalias Qualitativas da Hemoglobina

Resultam de mutações que afetam os genes responsáveis pelo sequenciamento e estrutura de cada tipo de polipeptídeo de globina e dão origem a variantes estruturais. As hemoglobinopatias são designações destinadas às hemoglobinas variantes que causam anemia hemolítica, policitemia ou anemia falciforme e são transmitidas à descendência segundo um padrão autossómico recessivo. (Naoum e Bonini-Domingos, 2007)

A hemoglobina S é uma das variantes mais frequentes e forma-se quando o ácido glutâmico (Glu) é substituído por valina (Val), na posição 6 da cadeia polipeptídica da globina β. Esta troca de aminoácido altera a carga elétrica da hemoglobina, permitindo a sua separação. Indivíduos homozigóticos para a Hb S (Hb SS) sofrem de Anemia Falciforme. (Naoum e Naoum, 2008) (Naoum e Bonini-Domingos, 2007)

A Anemia Falciforme provoca alterações nos eritrócitos, são exemplo as células falciformes (eritrócitos em forma de foice) e as células em alvo, cuja forma pode ser observada na Figura24. Também é comum observar-se hipocromia, presença de eritroblastos e de corpos de Howell-Jolly (Figura 25 e Tabela xii). No hemograma, a HGB está entre 5-9g/dL, o VCM pode estar normal ou aumentado. Como os eritrócitos em forma de foice são destruídos, há uma anemia hemolítica, que leva ao aumento da Bilirrubina Indireta no soro. Como consequência a MO aumenta a eritropoiese no sentido de produzir mais eritrócitos face à sua destruição, isto leva ao aumento da concentração de reticulócitos. Através da técnica de HPLC é comum observar-se cerca de 90-98% de HbS e 2-10% de HbF, num paciente com esta anemia. (Naoum e Naoum, 2008)

b. Anomalias Quantitativas da Hemoglobina

Alterações nos genes que regulam a síntese quantitativa dos aminoácidos que compõem as diferentes cadeias de globinas (α, β, δ e γ). Pode haver diminuições no volume de síntese de uma das globinas com intensidades variáveis ou ausência de síntese. A maioria das talassemias obedecem ao modelo de herança Mendeliana, caraterizado pela falta de sintomas clínicos nos heterozigóticos e pela gravidade clinica nos homozigóticos. (Naoum e Bonini-Domingos, 2007)

As formas mais comum de talassemias devem-se à redução de globina α ou β, por isso a HbA (α2 β2) é a mais afetada. Esta redução provoca eritrócitos microcíticos e hipocrómicos. Quando há redução total de síntese de α ou β, as talassemias caracterizam-se por α0 ou β0 (Major). Por outro lado, quando a redução de síntese afeta parcialmente os genes alfa ou beta, indica-se α+ ou β+ (Minor). (Naoum e Naoum, 2008)

A β-talassemia é a forma mais importante, uma vez que é a que apresenta maior grau de morbidade e mortalidade, causada pela anemia hemolítica que afeta os doentes que sofrem com esta doença. A anemia hemolítica ocorre, pois como a síntese de globina β está afetada, a globina α, que apresenta produção normal, vai precipitar dentro dos eritrócitos, uma vez que não são formados os tetrâmeros α2 β2. Essa precipitação deforma os eritrócitos que são retirados da corrente sanguínea e destruídos no baço, provocando também esplenomegalia (aumento do baço). Para o estudo laboratorial desta talassemia é muito importante o hemograma e HPLC para a quantificação das várias Hbs, uma vez que a HbA2 tem tendência

a aumentar. Na Tabela xxi é possível ver os diferentes tipos de β-talassemia. (Naoum e Naoum, 2008)(Naoum e Bonini-Domingos, 2007)

Tabela xxi: Tipos de β-talassemia e suas características.

Classificação	Características
Minor	Heterozigotia (β/β^+); Anemia ligeira, hipocrómica e microcítica; HbA2 elevada (>4% a 7%)
Intermédia	Homozigotia (β^+/β^+); Anemia moderada, hipocrómica e microcítica; Esplenomegalia; HbA2 >4% e HbF 10-60%.
Major	Ausência de síntese de cadeias (β^0/β^0); Anemia severa; Dependência de transfusões desde o 1°ano de vida; Hepatoesplenomegalia; Não há HbA e HbF elevada (20-100%); Eritroblastos no esfregaço sanguíneo.

4.5 Velocidade de Sedimentação

A Velocidade de Sedimentação (VS) é a velocidade (mm/h) com que os eritrócitos sedimentam no fundo de uma suspensão de plasma sanguíneo, devido à capacidade do plasma reduzir a carga eletrostática na superfície dos eritrócitos. Pode auxiliar a avaliação de diversos estados patológicos, não sendo específica de nenhum deles. A sedimentação dos eritrócitos fornece uma medida do nível das proteínas de fase aguda e, portanto avalia processos infeciosos, inflamatórios ou neoplásicos (Tabela xxii). Elevados níveis de fibrinogénio e imunoglobulinas favorecem uma VS aumentada, pois diminuem a carga negativa à volta dos eritrócitos e estes agregam. (Hachem *et al.*, 2010)

Considerado um marcador de rotina laboratorial como indicador de doença ativa, sofreu algumas adaptações, na sua metodologia, em relação ao método de referência de Westergren. Este método manual tem a duração de 1h pelo que não é o ideal para um laboratório com um volume de trabalho elevado.

No laboratório é usado o Test 1 THL (ALIFAX), utiliza a fotometria cinética capilar e usa o sangue total do tubo de EDTA. Os tubos são colocados em *racks* apropriadas e homogeneizados lentamente durante cerca de 2min. Depois o sangue é retirado diretamente do tubo de colheita por uma agulha de aspiração, é distribuído num capilar e é centrifugado. A temperatura da área de deteção é mantida a 37°C. O sistema utiliza um microfotómetro de raios infravermelhos com um comprimento de onda de luz de 950nm. Os impulsos elétricos

gerados pelo detetor de fototodiodo relacionam-se com a concentração dos eritrócitos presentes no capilar. Estes impulsos são então usados para delinear uma curva de sedimentação para cada amostra e utilizando um modelo de regressão linear são transformadas em valores comparáveis com os de Westergren. O sistema realiza 110 análises numa hora. (Plebani *et al.*, 1998)(Santos, Cunha e Cunha, 2000)

Tabela xxii: Causas do aumento da VS e exemplos de condições que dificultam o seu aumento.

		Valor Referência
VS aumentada	Pós-operatório; Durante a gravidez; Infeções agudas e cronicas; Mieloma múltiplo; Anemias graves; Cirrose hepática; Neoplasias; Linfomas.	Adultos M: <10mm F: <20mm
Condições que dificultam o aumento da VS	Anemia Falciforme; Coagulação intravascular disseminada; Esferocitose hereditária; Policitemia; Uso de anti-inflamatorios.	

V. Microbiologia

A Microbiologia estuda os diferentes microrganismos que vivem no interior do nosso organismos, sobre o nosso corpo e mesmo ao nosso redor, assim como as doenças que estes nos podem provocar. Estes micróbios podem ser divididos em bactérias, vírus, fungos e parasitas. (Murray, 2010)

Bactérias

As bactérias são organismos procariontes, não apresentam membrana nuclear e por isso o seu material genético encontra-se espalhado no citoplasma celular. São unicelulares, não possuem mitocôndrias, complexo de Golgi nem retículo endoplasmático. Reproduzem-se assexuadamente e a maioria pode ser dividida em dois grupos: bactérias de Gram positivo e de Gram negativo. As bactérias de Gram positivo têm uma parede celular com uma espessa camada de peptidoglicano, enquanto as bactérias de Gram negativo possuem uma parede com uma fina camada de peptidoglicano e uma membrana externa (Figura 30). (Murray, 2010)

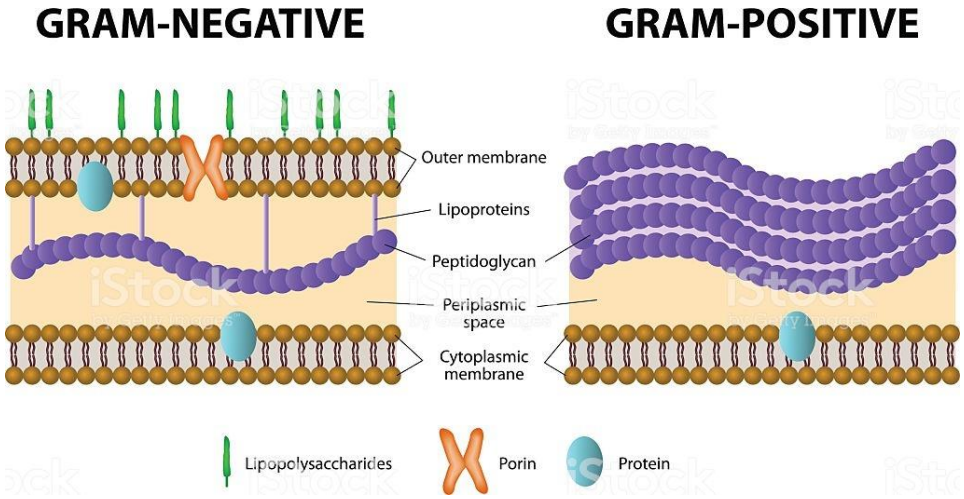

Figura 30: Constituição da parede celular de bactérias de Gram negativo e de Gram positivo.

Fonte: (IStock, 2018)

Mas nem todas as bactérias apresentam parede celular como é o caso dos micoplasmas (ex: *Mycoplasma hominis*) e ureaplasmas (ex: *Ureaplasma urealyticum*), que apenas possuem uma membrana flexível o que dificulta a sua identificação ao microscópio por não terem uma forma definida.

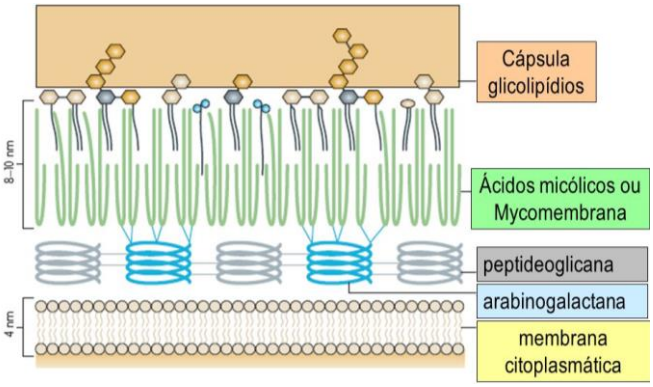

Figura 31: Constituição da parede celular das micobactérias.
Fonte: (Campos, 2014)

Existem ainda as micobactérias, que estruturalmente são bactérias de Gram negativo, pois possuem uma fina camada de peptidoglicano, no entanto não coram como tal devido ao alto teor lipídico (ácidos micólicos) da sua parede celular, que as impermeabiliza aos corantes aquosos usados na coloração de Gram e lhes dá resistência ao diferenciador álcool-ácido utilizado na coloração de Ziehl-Neelsen (Figura 31). (Campos, 2014)

No Laboratório de Microbiologia do SPC as bactérias são o microrganismo mais pesquisado e a sua identificação é feita, primeiro preliminarmente, através da forma (bacilo, coco), tamanho (1 a 20µm) e arranjo espacial (cadeia, aglomerados) e depois definitivamente através de propriedades fenotípicas e genotípicas. (Murray, 2010)

Para o diagnóstico correto de infeção é necessário conhecer muito bem o microbiota endógeno associado ao local da infeção, a patogenicidade e virulência de cada bactéria e o estado imunológico do hospedeiro, pois há bactérias que são oportunistas e apenas causam doença a pessoas imunocomprometidas.

Vírus

Os vírus são as menores partículas infeciosas (18 a 600nm) e não podem ser observados ao microscópio ótico, ao contrário das bactérias. Os vírus são constituídos por um único tipo de ácido nucleico DNA ou RNA e por uma cápsula proteica que envolve o genoma e dá a forma ao vírus. Pode ainda ter um envelope como membrana exterior que se forma a partir de uma membrana celular da célula hospedeira modificada pela introdução de proteínas codificadas pelo vírus. São parasitas intracelulares obrigatórios. (Murray, 2010)

O vírus pode ter uma rápida replicação e levar à destruição da célula, permanecer na célula por longos períodos de tempo, sem que esta lise, como acontece no Vírus da Hepatite C (HCV), levando a uma infeção crónica em que há uma produção contínua de viriões ou ainda transformar uma célula benigna em maligna como no caso do Papilomavírus Humano (HPV).

No Laboratório de Microbiologia do SPC a pesquisa de vírus é feita por Biologia Molecular ou Imunofluorescência direta, no caso de vírus respiratórios.

Fungos

Os fungos são organismos eucariontes, tendo portanto um núcleo bem definido rodeado por uma membrana nuclear que o separa do citoplasma. Possuem mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmático. Têm também uma parede celular constituída por quitina e alimentam-se por absorção. Podem ser unicelulares (leveduras), multicelulares (fungos filamentosos) ou assumir ambas as formas (fungos dimórficos). (Murray, 2010)

São ubíquos na natureza e portanto nem sempre são patogénicos. Por exemplo as leveduras do género *Candida* são comensais do nosso organismo e normalmente não causam nenhum dano ao hospedeiro, mas quando há imunodepressão esta pode tornar-se patogénica provocando uma infeção. (Rossi *et al.*, 2011)

Os fungos podem ser observados diretamente ao microscópio ou identificados no sistema VITEK® 2.

Parasitas

Os parasitas são seres eucariontes, havendo alguns unicelulares e outros multicelulares. Podem ter variados tamanhos desde 1µm até 10 metros como é o caso das ténias. Podem parasitar o nosso organismo durante os seus ciclos de vida completos ou apenas no final do seu desenvolvimento, aproveitando-se dos nossos metabolitos e causando-nos doença. (Murray, 2010)

As infeções parasitárias estão muito relacionadas com a sua distribuição mundial, nem todos os parasitas conseguem habitar os mesmos ecossistemas e por isto é muito importante conhecer a epidemiologia associada a cada parasita para um diagnóstico diferencial e para a prevenção destas infeções. (Murray, 2010)

No dia-a-dia do laboratório a pesquisa de parasitas não é comum e quando é pedido normalmente a análise é feita nas fezes, por observação microscópica.

5.1 Produtos Biológicos

A pesquisa de todos os microrganismos mencionados anteriormente pode ser feita em diversos produtos biológicos, sendo os mais comuns: urina, fezes, expetoração, sangue, LCR, lavados e aspirados brônquicos, exsudados purulentos e exsudados ano-genitais. As diversas amostras requerem uma colheita, um transporte e um processamento específicos para obtenção de resultados fidedignos.

5.1.1 Urina

As infeções do trato urinário são a causa mais comum de infeções nosocomiais e por isto a urina é uma das amostras mais frequentes para pesquisa de bactérias. A via mais comum de infeção é a via ascendente, caracterizada pela subida de microrganismos pela uretra, principalmente organismos de origem entérica, como *Escherichia coli*, no entanto a cateterização da bexiga também é um risco. (Monteiro, 1993)(Grabe *et al.*, 2009)

As infeções urinárias podem ocorrer no trato urinário superior (parênquima renal, ureteres) ou inferior (bexiga, uretra), sendo a maioria dos casos na parte inferior. Podem ser classificadas como complicadas e não complicadas com base no nível de envolvimento tecidular. Infeções complicadas referem-se a pielonefrites (parênquima renal) ou prostatites e ocorrem devido a obstrução ou instrumentação do trato urinário. Infeções não complicadas englobam cistites (bexiga) ou uretrites (uretra) associadas a colonização bacteriana da mucosa uretral e da bexiga. (Amalaradjou e Venkitanarayanan, 2011)

O sexo feminino é mais vulnerável a este tipo de infeções, pois a uretra feminina é mais pequena, as bactérias acedem facilmente à bexiga e é muito próxima do ânus. A partir dos 50 anos a incidência desta infeção aumenta nos homens, devido a cateterização e doença prostática (fluídos prostáticos inibem crescimento bacteriano). (Mazili, Carvalho e Almeida, 2011)

Como dito anteriormente, *E.coli* é a bactéria responsável pela maioria das infeções não complicadas, que normalmente ocorrem no ambulatório, enquanto no meio hospitalar o espetro de bactérias envolvido é maior, abrangendo *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas spp*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Enterococcus spp* e fungos, estes últimos particularmente em doentes que estão sob terapêutica antibiótica. (Fonseca *et al.*, 2004)

a. Colheita

A urina é um líquido biológico estéril, mas a sua passagem na uretra arrasta os microrganismos que a colonizam, por isto a interpretação de uma urocultura nem sempre é fácil. É extremamente necessária a identificação do método de colheita, pois isto influencia a valorização ou não da presença de uma bactéria. Os principais métodos de colheita são: jato médio; punção de cateter urinário; punção supra-púbica e saco coletor em crianças. (Fonseca *et al.*, 2004)

b. Processamento laboratorial

As amostras de urina assim que chegam ao laboratório são semeadas no Uricult®, como se pode ver na Figura 32, correspondente ao meio Uriline 3 Enterococcus, que se encontra descrito em detalhe nos Anexos. Após incubação de 16 a 24 horas a 37°C, as culturas são examinadas. Na gelose CLED é feita a quantificação dos microrganismos presentes na urina, usando um esquema como o que se apresenta na Figura 33.

Figura 32: Exemplo de uma sementeira de urina.
Fonte: (Roche, 2018)

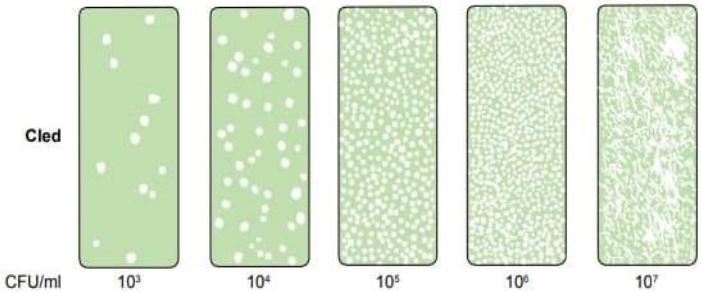

Figura 33: Esquema que permite estimar a concentração de bactérias na urina.
Fonte: (ORIONDiagnostica, 2018)

c. Interpretação de resultados

A valorização dos resultados tem em conta o método de colheita da urina, tipo de doente, sintomatologia e resultados de exames bacteriológicos anteriores.

Na urina colhida por micção do jato médio ou por punção de cateter urinário, uma contagem de colónias de $\geq 10^5$ UFC/mL é significativo de infeção urinária, quando há apenas uma bactéria, isto é uma cultura pura. Quando há dois tipos de colónias é valorizada a predominante. Quando há crescimento de três ou mais espécies bacterianas diferentes é

considerado contaminação, significando que houve uma má colheita ou um atraso no processamento da urina.

Na urina colhida por punção supra-púbica, dado ser uma técnica completamente assética, deverão ser valorizadas quaisquer espécies bacterianas que apareçam.

A urina colhida por saco coletor em crianças pode dar falsos positivos, por contaminação com a flora do períneo. (Fonseca *et al.*, 2004)

Na presença de uma urocultura positiva faz-se uma repicagem para gelose CLED, assim no dia seguinte quando for observado o resultado da identificação bacteriana e antibiograma, é possível confirmar se a cultura está pura e o resultado é fiável.

Depois de observar a gelose CLED do Uricult® e verificar positividade, observa-se a gelose MacConkey, que se encontra do outro lado do Uricult®, se houver crescimento neste meio estamos na presença de uma bactéria de Gram negativo e através da cor das colónias tanto neste, como na gelose CLED é possível dizer se fermenta ou não a lactose. Se não houver crescimento na gelose MacConkey, podemos estar na presença de *S.aureus* ou *Enterococcus spp*. As colónias castanhas-avermelhadas que apareçam na gelose *Enterococcus* só são valorizadas como *Enterococcus spp*, se apenas este estiver presente. As cartas escolhidas para a realização da identificação definitiva e antibiograma são escolhidas com base nesta identificação presuntiva.

Existem ainda alguns testes rápidos que ajudam o Técnico na identificação preliminar. Os mais usados no Laboratório de Microbiologia do SPC são: teste da citocromo-oxidase, teste da coagulase e o teste da catalase, para identificação presuntiva de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa, entre outros. Estes testes encontram-se descritos em pormenor nos Anexos.

5.1.2 Sangue

Uma infeção no sangue pode ser referida como septicémia e diz respeito à presença de bactérias ou fungos no sangue, bacteriemia e fungemia, respetivamente. A septicémia pode ser contínua ou intermitente. A contínua ocorre normalmente em paciente com infeções intravasculares (ex: endocardite, infeções associadas a cateteres intravasculares) e a intermitente ocorre em pacientes com infeções localizadas (ex: pulmões, sistema urinário). (Murray, 2010)

A cultura de sangue (hemocultura) é um dos procedimentos mais importantes realizados no laboratório de microbiologia clínica, uma vez que é uma das complicações mais significativas num processo infecioso. Consiste na cultura de um volume pré-definido de sangue colhido por punção venosa, após assepsia da pele e inoculação em recipiente apropriado. (Baron *et al.*, 2013)

Como o sangue é um produto biológico estéril, o isolamento de um microrganismo a partir duma hemocultura é geralmente o agente infecioso etiológico da infeção. Os microrganismos mais encontrados em hemoculturas são *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*., *Enterobacter* spp. e *Proteus* spp. (Fonseca *et al.*, 2004)(McMullen, Wilen e Burnham, 2017)

a. Colheita

A colheita de sangue é efetuada por punção venosa de uma veia periférica e é incorreto colher através de um cateter intravenoso. O volume é crítico, porque a concentração de microrganismos na maioria das bacteriemias é baixa. Num adulto devem ser colhidos 8 a 10mL por frasco de hemocultura. Num recém-nascido apenas duas gotas a 2mL por frasco e numa criança 3 a 5mL. (Baron *et al.*, 2013)

A desinfeção do local da punção é muito importante, de modo a não haver contaminação com microrganismos que colonizam a pele. (Murray, 2010)

Quando há suspeita de infeção associada ao cateter, deve-se efetuar uma única colheita através do cateter, uma outra colheita por punção venosa periférica e retirar o cateter e cortar assepticamente cerca de 3 a 5cm da porção terminal e colocá-lo em recipiente estéril. Com este procedimento é possível observar se o microrganismo que se encontra no sangue é o mesmo que se encontra no cateter, fazendo, assim, o diagnóstico de infeção associada ao cateter. (Baron *et al.*, 2013)

Os sinais clínicos duma septicemia dizem respeito à resposta do sistema imunitário contra endotoxinas ou exotoxinas dos organismos e ocorrem 1 hora após o microrganismo entrar na corrente sanguínea. Assim, poucos ou nenhuns microrganismos devem estar no sangue quando o paciente se torna febril. Por isto, recomenda-se fazer 2 a 3 colheitas de sangue num período de tempo que pode variar dependendo da situação clínica, em locais diferentes. Nunca colhendo em pico febril e se possível fazer as colheitas antes do início da antibioterapia. (Murray, 2010) (Baron *et al.*, 2013)

As amostras de sangue são inoculadas diretamente em frascos de cultura contendo meio nutritivo, esferas poliméricas adsorventes que neutralizam algum antibiótico que tenha sido administrado ao paciente e anticoagulante polianetolsulfato (SPS), que inibe a atividade bactericida do soro, a fagocitose, inativa o complemento e neutraliza lisozimas. No CHL são usados três tipos de frascos: frasco aeróbio (tampa verde), frasco anaeróbio (tampa laranja) e frasco pediátrico (tampa amarela). Quando estes frascos chegam ao laboratório, período máximo de 2 horas, devem ser colocados no equipamento BACT/ALERT® 3D. As amostras de sangue nunca dever ser refrigeradas. (Fonseca *et al.*, 2004) (Baron *et al.*, 2013)

b. Processamento laboratorial

O Sistema BACT/ALERT® 3D, onde são colocados os frascos de hemocultura, é utilizado como sistema de deteção de microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos (bactérias e fungos) e como meio de cultura com condições nutricionais e ambientais adequadas aos microrganismos geralmente detetados em infeções sanguíneas ou noutros fluidos biológicos normalmente estéreis. O Sistema de Deteção Microbiana utiliza um sensor colorimétrico e a reflexão de luz para monitorizar a presença e a produção do dióxido de carbono (CO_2) dissolvido no meio de cultura. Se existirem microrganismos na amostra testada, é produzido CO_2, uma vez que os microrganismos metabolizam os substratos existentes no meio de cultura.

Figura 34: Cor do sensor num frasco de hemocultura positiva e negativa.
Fonte: (bioMérieux, 2011)

Quando o crescimento dos microrganismos produz CO_2, a cor do sensor permeável ao gás, instalado no fundo de cada frasco de cultura, muda de verde-azulado para amarelo (Figura 34). (bioMérieux, 2011)

As cores mais claras resultam num aumento das unidades de refletância monitorizada e registada pelo aparelho a cada 10 min. (Thorpe *et al.*, 1990) (Wilson *et al.*, 2007)

Uma vez colocados no equipamento, os frascos são incubados durante cinco dias ou até serem indicados como positivos. Se após cinco dias forem negativos são eliminados.

Quando as amostras são positivas é feito um esfregaço que é posteriormente corado pela técnica de Gram e observado ao microscópio e repicagens para meio de cultura sólido a partir do frasco de hemocultura. O meio utilizado na rotina é a gelose de sangue (COS) e a

sementeira é feita pela técnica de esgotamento do inóculo à superfície em meio sólido. Quando os frascos de hemocultura anaeróbia são positivos a sementeira é feita em dois meios de gelose de sangue, um é incubado em aerobiose e outro em anaerobiose, uma vez que podemos estar na presença de um microrganismo anaeróbio estrito ou facultativo. A incubação destes meios é feita a 37°C, durante 18 a 24 horas, se for anaeróbio poderá prolongar-se o tempo de incubação até 48 horas. Caso não cresça nada em gelose de sangue e na coloração de Gram apenas sejam observados leucócitos, conclui-se que é um falso positivo. No entanto, se o Gram apresentar pequenos bacilos, a amostra de sangue deve ser semeada em gelose de chocolate para o crescimento de *Haemophilus*.

Como disse anteriormente, se se suspeitar de uma infeção associada ao cateter, este é também enviado para o laboratório. Assim que chega é incubado no caldo nutritivo BHI a 37°C durante 24 horas, o que vai permitir o crescimento de microrganismos aeróbios exigentes. No dia seguinte, com uma ansa de 10µ, o caldo é semeado em gelose de sangue (COS) e é feita incubação a 37°C.

c. Interpretação de resultados

A coloração de Gram é a primeira coisa a ser observada quando há uma hemocultura positiva. Nesta observação é possível identificar a existência de cocos ou bacilos e se são bactérias de Gram positivo ou negativo. Se a infeção for provocada por um fungo, é possível observar leveduras ou hifas no esfregaço.

Com os resultados do Gram torna-se mais fácil a interpretação das colónias que aparecem na gelose de sangue, uma vez que já temos o raciocínio direcionado para um tipo de microrganismo. Em complementaridade com o aspeto das colónias que aparecem no meio sólido são também utilizados testes rápidos: teste da citocromo-oxidase, teste da coagulase, teste da catalase, prova da optoquina para identificação preliminar de *Streptococcus pneumoniae* (sensível) e a prova da bacitracina para identificação preliminar de *Streptococcus pyogenes* (sensível) e *Streptococcus agalactiae* (resistente). Estes testes, alguns comuns à identificação de bactérias do trato urinário, encontram-se descritos em pormenor nos anexos.

Depois da observação do Gram e do aspeto das colónias há condições para a escolha da carta apropriada para realização da identificação definitiva e antibiograma no VITEK® 2.

Durante a colheita de sangue para hemocultura, se as condições de assepsia não forem rigorosamente seguidas, pode haver contaminação com o microbiota comensal da pele. Posto

isto, cabe ao Microbiologista perceber se as colónias que cresceram são realmente indicativas de infeção ou se correspondem a bactérias que vivem na pele (*Staphylococcus* coagulase negativo, *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Micrococcus* spp. e *Propionibacterium acnes*), normalmente são Gram positivo. (Rita e Araujo, 2012)

5.1.3 Fezes

As infeções do aparelho gastrointestinal têm alta incidência na população em geral, com grande morbilidade em determinados grupos etários (crianças e idosos). (Fonseca *et al.*, 2004)

O trato gastrointestinal é colonizado por bactérias que têm um papel importante na digestão de alimentos e na resistência à colonização por microrganismos patogénicos. Estas bactérias benéficas ao nosso organismo aparecem nas fezes, no entanto não são significado de doença, logo é muito importante saber quais as bactérias que realmente podem provocar infeção gastrointestinal. As bactérias que vivem no trato gastrointestinal são essencialmente de Gram negativo anaeróbias. (Paixão e Castro, 2016)

A grande manifestação clínica desta infeção é a diarreia, que pode ser provocada pela produção de enterotoxinas que causam alterações fisiológicas no epitélio intestinal, como acontece nas infeções provocadas por *Vibrio cholerae*, agente etiológico da cólera. Esta enterotoxina estimula a mucosa intestinal a secretar água e eletrólitos, no entanto microscopicamente o epitélio intestinal aparece normal. Um outro mecanismo que leva à produção de diarreia é a destruição do epitélio que ocorre como resultado da invasão do mesmo por certas bactérias, como *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Campylobacter* sp. e *Yersinia enterocolitica*. As infeções gastrintestinais não são provocadas apenas por bactérias, os vírus e os parasitas também são agentes etiológicos importantes e em determinadas situações devem ser pesquisados. (Gilligan, Shapiro e Smiley, 2003)

Para um correto diagnóstico devem ser tidos em conta alguns aspetos, como sinais e sintomas clínicos, viagens intercontinentais, ingestão de alimentos, toma de antibióticos, estado imunológico do hospedeiro e o tipo de diarreia. (Fonseca *et al.*, 2004)

a. Colheita

Devem ser obtidas até um total de três amostras de fezes colhidas em dias diferentes, aumentado, assim, a probabilidade de isolar o microrganismo, pois a sua emissão não é contínua. (Murray, 2010)(Fonseca *et al.*, 2004)

Devem ser transportadas imediatamente para o laboratório em recipiente estéril hermeticamente fechado, para evitar acidificação das fezes (causada pelo metabolismo das bactérias) que é tóxica para a *Shigella* sp. (Murray, 2010)

b. Processamento laboratorial/Interpretação de resultados

O exame mais comum é a coprocultura, em que é feita a pesquisa de bactérias. Por rotina as bactérias pesquisadas são *Salmonella* sp. e *Shigella* sp. Se for necessário a pesquisa de outros microrganismos dever ser especificado na requisição feita pelo médico.

Pesquisa de *Salmonella* sp. e *Shigella* sp.

Primeiro é feita uma coloração de Gram e observação ao microscópio. Neste ponto é observada a quantidade de leucócitos e a predominância ou não de uma morfologia bacteriana. Os leucócitos normalmente aparecem em fezes de pacientes com destruição do epitélio intestinal, no entanto estas células também podem estar presentes em fezes de pacientes com doença inflamatória não infeciosa, logo o exame microscópico às fezes deve ser interpretado com cuidado. (Gilligan, Shapiro e Smiley, 2003)

Se na coloração de Gram forem observados bacilos de Gram negativo encurvados e móveis, ter especial atenção, pois podemos estar na presença de *Campylobacter jejuni* ou *Vibrio cholerae*.

De seguida as fezes são semeadas em gelose Hektoen e gelose SS, meios seletivos de isolamento e diferenciação para a deteção de espécies de *Salmonella* sp. e *Shigella* sp. Estes meios estão descritos em detalhe nos anexos. As fezes são também colocadas num caldo de enriquecimento de Selenito F, que favorece o crescimento de *Salmonella* sp. É feita uma incubação a 37°C durante 18 a 24 horas.

No dia seguinte as placas de Hektoen e SS, inoculadas no dia anterior, são observadas dando logo um parecer ao Técnico se se trata de algo patogénico ou não. Mesmo em caso de negatividade nas primeiras culturas, o caldo é repicado para os mesmos meios sólidos. É feita

nova incubação nas mesmas condições e no dia seguinte realiza-se a observação final destes meios.

Quando há crescimento de *Salmonella* sp. ou *Shigella* sp deve ser feita serotipagem. No Laboratório de Microbiologia do SPC apenas se faz da *Salmonella* sp.

Determinação do serotipo de *Salmonella*

É baseada no esquema de Kauffmann-White, que classifica os serotipos de acordo com a combinação de antigénios somáticos (O) e antigénios de flagelos (H) de *Salmonella*. São utilizados soros aglutinantes (anti-O e anti-H), que se destinam à identificação serológica de culturas de *Salmonella* para fins epidemiológicos e de diagnóstico, utilizando o método de aglutinação em lâmina.

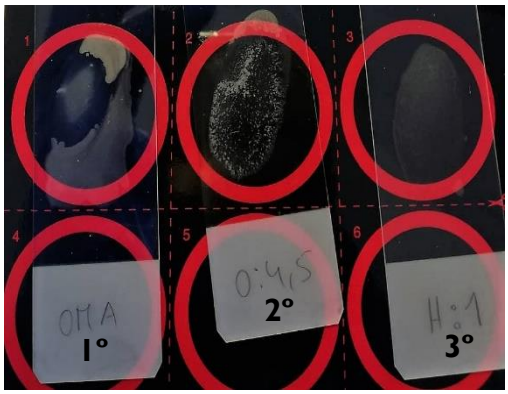

Figura 35: Teste de aglutinação em lâmina com soros aglutinantes. 1° OMA (soro polivalente O); 2° O:4,5 (soro monovalente O); 3° H:i (soro monovalente H).
(Fonte: Laboratório de Microbiologia do SPC do CHL)

Deve-se iniciar o teste, primeiro com os soros polivalentes, e depois com os soros específicos (polivalente O e monovalente O, seguido de polivalente H e monovalente H). Deposita-se uma gota de anti-soro na lâmina e recolhe-se, com uma ansa, uma colónia de *Salmonella* que é adicionada à gota. Faz-se um ligeiro movimento rotativo à lâmina e observa-se a formação ou não de aglutinação. Na Figura 35 é possível observar a aglutinação nos 3 soros testados, de seguida analisando a tabela de Kauffmann-White conclui-se que o serotipo é Typhimurium. (Grimont e Weill, 2008)

Pesquisa de toxina de *Clostridium difficile*

Este é outro teste muito pedido, uma vez que esta bactéria de Gram positivo anaeróbia constitui o principal agente etiológico da diarreia e colite associadas a antibióticos. A doença desenvolve-se quando é permitida a proliferação do microrganismo no cólon, mais vulgarmente após o uso de antibióticos que destroem o microbiota intestinal. A bactéria pode libertar duas toxinas (A e B) que são responsáveis pelas manifestações clínicas. A Glutamato Desidrogenase (GDH) de *Clostridium difficile* é uma enzima produzida em grandes quantidades por estirpes toxigénicas e não toxigénicas, sendo por isso um bom marcador.

É utilizado o CERTEST *Clostridium difficile* GDH+Toxin A+B em formato de cassete (Figura 40), que realiza um imunoensaio cromatográfico para a deteção qualitativa simultânea de Glutamato Desidrogenase (GDH), Toxina A e B de *Clostridium difficile* em amostras de fezes, permitindo um diagnóstico presuntivo de infeção por esta bactéria. Todas as tiras do teste têm anticorpos monoclonais que em contacto com os antigénios específicos da amostra formam um complexo que aparece em forma de banda corada a vermelho na zona de teste.

O teste tem também anticorpos anti-proteínas específicas que funcionam como controlo, se as três linhas de controlo verdes não surgirem, o teste é inválido. (Peterson *et al.*, 2011)

A interpretação dos resultados pode variar, sendo que os resultados mais comuns são os que se encontram na Figura 36.

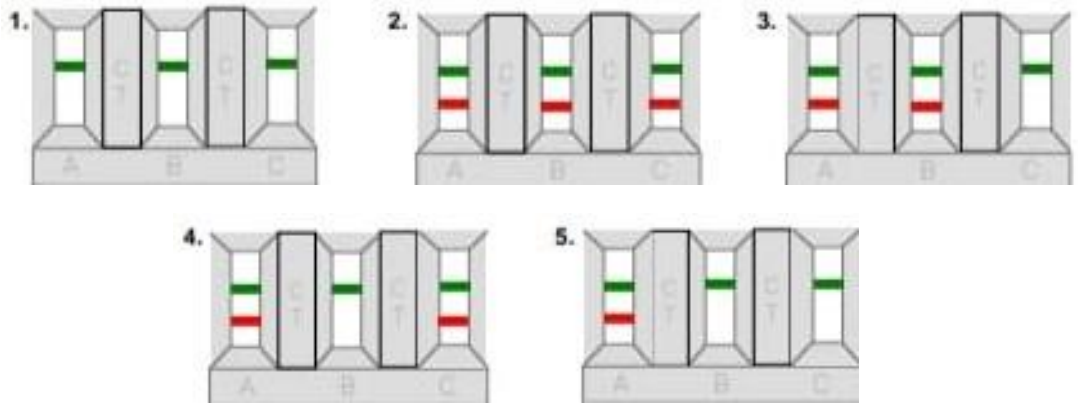

Figura 36: Resultados mais comuns do CERTEST *Clostridium difficile* GDH+Toxin A+B.
1 – GDH (tira A) negativo, toxina A (tira B) negativo, toxina B (tira C) negativo.
2 – GDH positivo, toxina A positivo, toxina B positivo.
3 – GDH positivo, toxina A positivo, toxina B negativo.
4 – GDH positivo, toxina A negativo, toxina B positivo.
5 – GDH positivo, toxina A negativo, toxina B negativo.
Fonte: (Biotec, 2013)

Quando apenas a tira A (GDH) é positiva, devem-se proceder a testes moleculares, para perceber se não há mesmo toxinas ou se há mas estão em quantidade inferior ao valor limite de deteção. Se não houver toxinas significa que o paciente apenas está colonizado por uma estirpe não toxigénica e não tem infeção. Para estes testes o Laboratório de Microbiologia do SPC utiliza o GeneXpert® IV.

Teste molecular Xpert® *Clostridium difficile*

O teste utiliza a reação em cadeia da polimerase (PCR) automática em tempo real.

É um teste qualitativo de diagnóstico *in vitro* concebido para a deteção rápida de *C. difficile tcdB* (gene da toxina B), *cdt* (gene da toxina binária) e deleção de um nucleótido na posição 117 do gene *tcdC*. O fator de virulência primário é a citotoxina B e quando detetada juntamente com a toxina binária é frequentemente um indicador de doença mais grave ou recidivante. Normalmente as estirpes associadas à deleção de *tcdC* produzem também a toxina binária. Os isolados de *C. difficile* que são negativos para *tcdB* mas contêm apenas genes da toxina binária podem produzir sintomas semelhantes a estirpes de *C. difficile* toxigénico, mas desconhece-se atualmente a relevância clinica de tais estirpes. (Sambol *et al.*, 2000)

Pesquisa de vírus

Os únicos vírus pesquisados no Laboratório de Microbiologia do SPC do CHL são o Rotavírus e o Adenovírus e normalmente é um teste apenas realizado em crianças, uma vez que os vírus causam 40% das diarreias em crianças com menos de 4 anos de idade. Como são altamente contagiosos, transmitem-se muito rapidamente nas populações pediátricas, que são grupos de risco para estas infeções.

É utilizado um teste imunocromatográfico de despistagem para a fase aguda. As amostras colhidas após esta fase podem conter títulos de antigénios abaixo do limite de sensibilidade do reagente. É constituído por uma membrana de nitrocelulose sensibilizada com anticorpos dirigidos contra o Rotavírus e o Adenovírus (linhas teste). A especificidade do teste deve-se a estes anticorpos monoclonais dirigidos, um contra as proteínas VP6 do grupo A do Rotavírus e o outro contra o antigénio de hexona do Adenovírus. Se a amostra tiver antigénios virais há a formação de complexos antigénio-anticorpo aparecendo uma linha vermelha na zona de teste corresponde ao vírus que está presente.

Este teste possui também uma linha de controlo (anticorpo policlonal anti IgY) que tem que aparecer sempre que se faz o teste, pois confirma o correto funcionamento do mesmo. O resultado é visível em 10 minutos. Se aparecerem 3 linhas (C-R-A) significa que estamos na presença de uma infeção simultânea por Rotavírus e Adenovírus. (Kas *et al.*, 2013)

Pesquisa de parasitas

As parasitoses intestinais são infeções de transmissão maioritariamente fecal-oral, resultante da ingestão de quistos ou ovos de parasitas. A maioria das parasitoses intestinais é bem tolerada pelo hospedeiro imunocompetente, evoluindo de forma assintomática ou com alguns sintomas como dor abdominal, náuseas ou diarreia.

Esta patologia infeciosa é uma causa importante de morbilidade em crianças, podendo originar doença crónica com repercussão na juventude e idade adulta. Na última década, a prevalência foi inferior a 6%, devendo-se principalmente a *Giardia lamblia* e *Enterobius vermicularis*. (George, 2017)

O exame parasitológico de fezes é feito após concentração. Normalmente são colhidas até 3 amostras em dias diferentes, durante um período máximo de 10 dias.

É utilizado o método ECO, um sistema de enriquecimento para parasitologia da BioRépair. Tem como finalidade concentrar num pequeno volume os elementos parasitários que se encontram numa grande quantidade de fezes. Primeiro as fezes são colocadas num tubo fechado com formol (conservante), depois agita-se no vortex e adiciona-se éter etílico (solvente apolar) e lugol (corante para destacar as estruturas dos parasitas) e volta-se a agitar tudo. Após esperar alguns minutos o tubo de filtro é conectado ao tubo de amostra e o sistema inteiro é girado de cabeça para baixo. A suspensão filtrada é centrifugada, obtendo-se assim um sedimento que contém os elementos parasitários. Este sedimento é posteriormente observado ao microscópio, inicialmente com a objetiva de 10X (observação de ovos e larvas) e depois com a objetiva de 40X (observação de quistos). Deve-se percorrer metodicamente toda a preparação. (Truant *et al.*, 1981)

5.1.4 Expetoração e outras secreções respiratórias

O pulmão é o órgão mais vulnerável às infeções provocadas pelo ambiente externo, uma vez que é constantemente exposto a partículas, produtos químicos e microrganismos infeciosos que andam no ar. As infeções ocorrem quando as barreiras do trato respiratório superior são ultrapassadas.

A pneumonia é uma das principais infeções que pode causar a morte e atinge principalmente crianças, idosos e imunodeprimidos. As bactérias mais frequentes nas pneumonias da comunidade são *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*, enquanto nas pneumonias nosocomiais são mais frequentes bacilos de Gram negativo, como *Escherichia*

sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., etc. Nas crianças, o vírus sincicial respiratório (RSV) é a causa mais comum de infeção respiratória aguda, causando quase 34 milhões de episódios por ano em todo o Mundo.

A tuberculose é outra doença respiratória provocada por micobactérias, geralmente pelo *Mycobacterium tuberculosis* com transmissão direta de pessoa a pessoa através da inalação de gotículas de saliva contendo bacilos. É uma doença que pode levar à morte, mas cuja incidência tem vindo a descer a uma taxa de 1,5% ao ano. (Fórum Internacional de Sociadades Respiratórias, 2017)

a. Colheita

O trato respiratório inferior normalmente é estéril, mas durante a colheita da amostra biológica pode haver contaminação com a flora normal do trato respiratório superior (*Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, leveduras e enterobactérias). As amostras do trato respiratório inferior podem ser colhidas por várias técnicas como aspiração endotraqueal, pulmonar, broncoscopia, expetoração induzida, etc.

A expetoração deve ser a primeira da manhã, e antes de expetorar o paciente deve lavar a boca só com água. Deve ser colhida após tosse profunda e as amostras salivares devem ser desprezadas. Se a expetoração for escassa, pode-se induzir a mesma por nebulização com soro fisiológico.

A aspiração endotraqueal permite a obtenção de secreções brônquicas e a broncoscopia possibilita a aquisição de lavados bronco-alveolares. O aspirado pulmonar é colhido durante uma cirurgia. As amostras devem ser colocadas em recipientes estéreis. (Fonseca *et al.*, 2004)

b. Processamento laboratorial/Interpretação de resultados

Por rotina, a expetoração e as outras secreções enviadas para realização de testes bacteriológicos são sempre tratadas da mesma forma. Se for necessário a pesquisa de outros microrganismos, o médico deve indicar quais os agentes suspeitos para o laboratório utilizar outros meios de pesquisa.

Primeiro é feita uma coloração de Gram que permite avaliar a qualidade da amostra. É possível observar se há contaminação com a flora normal do trato respiratório superior e se a amostra é maioritariamente salivar. Quando são observadas mais de 25 células epiteliais por campo com a objetiva de 10X, deve-se rejeitar a amostra, pois significa que a maior parte é saliva. Nesta coloração observar se há a predominância de algum tipo de bactéria, presença de leucócitos polimorfonucleares e existência ou não de fungos. Os fungos, em pequeno número, podem fazer parte da flora normal, contudo as infeções fúngicas aparecem em caso de situação fisiológica de debilidade do sistema imunitário do hospedeiro. Tanto a imunossupressão fisiológica, como a toma de antibióticos aumentam a probabilidade de um indivíduo contrair um destes tipos de infeções.

De seguida é feita a cultura pela técnica de esgotamento do inóculo à superfície em meio sólido em gelose de sangue e de chocolate. Incuba-se a 37°C durante 18 a 24 horas. No dia seguinte procede-se à leitura das placas, e de acordo com o Gram, com a informação clínica e o tipo de colónias, valoriza-se ou não o crescimento bacteriano. Quando valorizada uma colónia no meio da flora, essa deve ser isolada para meio apropriado, para se obter uma cultura pura para posterior identificação e realização do antibiograma.

Quando se suspeita da presença de *H. influenzae* numa expetoração em que o esfregaço apresente uma flora bacteriana escassa, muitos leucócitos polimorfonucleares e muitos cocobacilos de Gram negativo pequenos, e que haja crescimento em gelose de chocolate com colónias creme ou acinzentadas, pequenas, opacas características desta bactéria, deve-se repicar para uma gelose de chocolate e incubar a 37°C durante 18 a 24 horas. No dia seguinte retira-se uma colónia, semeia-se em gelose Mueller Hinton E e colocam-se 3 discos, um com fator V, outro com fator X e outro com fator X+V, que se difundem no meio. Como esta bactéria é exigente e necessita de ambos os fatores, apenas vai crescer à volta do disco com fator X+V. Por fim é feito um antibiograma manual utilizando uma galeria de teste ATB™ HAEMO EU, onde a bactéria a testar é colocada em suspensão com opacidade 0,5 McFarland e inoculada na galeria que contém diferentes antibióticos. É feita incubação e no dia seguinte observa-se se há ou não turvação nos diferentes poços. Se houver turvação, significa que houve crescimento bacteriano e por isso a bactéria é resistentes ao antibiótico corresponde ao poço com turvação, se não houver significa que a bactéria é sensível e o antibiótico inibiu o seu crescimento. (Fonseca *et al.*, 2004)(EUCAST, 2017)

Pesquisa de micobactérias

As micobactérias são bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR), uma vez que possuem ácidos micólicos na sua parede celular, que impedem a descoloração pelo ácido-álcool usado na coloração de Ziehl-Neelsen (técnica explicada nos anexos). São aeróbios, não formadores de esporos e sem mobilidade, que apresentam velocidades de crescimento lentas. (Thorpe *et al.*, 1990)

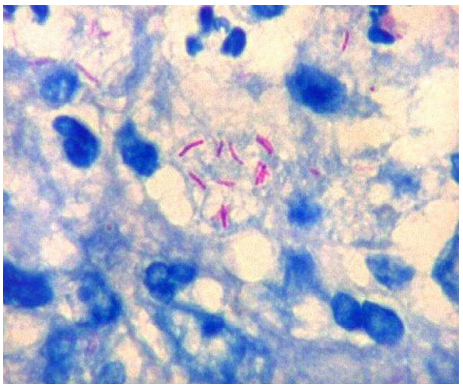

Figura 37: BAAR corados pela técnica de Ziehl-Neelsen.
Fonte: (Fernandes *et al.*, 1998)

Realiza-se um esfregaço que é corado pela técnica de Ziehl-Neelsen e observa-se ao microscópio pesquisando bacilos cor-de-rosa (BAAR), como os que se observam na Figura 37. O exame direto é de fácil execução e pouco dispendioso, mas possui baixa sensibilidade, uma vez que são necessários 10^4 bacilos por mL de amostra para que sejam detetados e apenas identifica o género. No entanto um exame direto positivo faz diagnóstico presuntivo e é indicador para se iniciar a terapia. (Silva, 2011)(Fernandes *et al.*, 1998)

É também efetuado um exame cultural, visto ser o meio de referência, mas antes da cultura é necessário proceder-se à descontaminação da amostra. Utiliza-se o kit MYCOPROSAFE® que faz a descontaminação e concentração da amostra para isolamento e identificação das micobactérias. O hidróxido de sódio-N-acetil-L-cisteína usado mata todos os microrganismos menos as micobactérias que são resistentes ao pH alcalino. N-acetil-L-cisteína é uma substância redutora que reduz as ligações dissulfeto das proteínas do muco, o que diminui a viscosidade e liquefaz as amostras, permitindo a melhor sedimentação dos bacilos durante a centrifugação. (Buijtels e Petit, 2005)

Depois de feita a descontaminação, as amostras são colocadas em frascos de BACT/ALERT MP para cultura, com um meio líquido com condições nutricionais para o crescimento de espécies micobacterianas. Estes frascos têm uma tampa vermelha, o que permite a sua distinção dos frascos de hemocultura. Os meios líquidos permitem uma maior sensibilidade quando comparados com os sólidos (12%), no entanto não permitem quantificar as micobactérias presentes. Antes da inoculação das amostras não estéreis deve-se adicionar aos frascos o suplemento de antibiótico, para reduzir a incidência de contaminação por bactérias que possam ter sobrevivido ao processo de descontaminação/concentração. Nas

amostras estéreis apenas se deve adicionar o líquido de reconstituição, que contém os componentes necessários para assegurar um crescimento ótimo das micobactérias presentes na amostra. Os frascos são, então, colocados equipamento BACT/ALERT® 3D, onde são incubados e continuamente monitorizados quanto à presença de micobactérias. Aqui são utilizados os mesmos princípios de deteção dos frascos de hemocultura, explicado anteriormente. Depois de serem introduzidos no aparelho devem permanecer lá 42 dias ou até serem designados como positivos. (Thorpe *et al.*, 1990)

Se a cultura for positiva e o exame direto anteriormente feito for negativo, significa: a amostra está contaminada com microrganismos não micobacterianos, ou tem menos de 10^4 bacilos por mL. Para um diagnóstico correto devem ser analisadas 3 amostras de 3 dias consecutivos, uma vez que a emissão destes bacilos não é contínua.

Se a cultura for negativa e o exame direto anteriormente feito for positivo, pode significar que o processo de descontaminação não foi bem executado e o descontaminante acabou por matar as micobactérias, isto pode acontecer se o tempo de descontaminação for excedido.

Quando o resultado positivo da cultura é concordante com o exame direto anteriormente feito é realizada a identificação. A única identificação feita no Laboratório de Microbiologia do SPC é a do *Mycobacterium tuberculosis*. Se for uma micobactéria atípica a identificação é realizada num laboratório externo.

A deteção do *Mycobacterium tuberculosis* é realizada no sistema GeneXpert® usando o Xpert MTB/RIF Assay. É um teste de diagnóstic*o in vitro*, semi-quantitativo de "nested" PCR em tempo real que faz a deteção de DNA do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras respiratórias e a deteção de mutações do gene *rpoB*, associadas à rifampicina, em amostras de pacientes com risco de resistência à rifampicina (fármaco de primeira linha habitualmente usado na terapia anti-tuberculose). O sistema integra e automatiza o processamento das amostras, a amplificação dos ácidos nucleicos e a deteção das sequencias-alvo. São utilizados cartuchos descartáveis, de utilização única, que contêm os reagentes de PCR e onde decorre o processo, assim a contaminação cruzada entre amostras é eliminada. Os resultados são interpretados pelo sistema através da medição de sinais fluorescentes.

Um resultado positivo por métodos moleculares não indica necessariamente a presença de organismos viáveis, se a cultura dessa amostra for negativa significa que o

microrganismo está morto e já não tem interesse clínico. Logo o método de referência é sempre a cultura. (Rattan, Kalia e Ahmad, 1998)

Pesquisa de *Streptococcus pneumoniae* e *Legionella pneumophila*

A pesquisa destas 2 bactérias que provocam pneumonias pode ser realizada por um teste rápido. Este teste apenas é realizado quando requerido pelo médico.

S. pneumoniae é o principal agente da pneumonia adquirida na comunidade e tem alta taxa de mortalidade. *L. pneumophila* são cocobacilos de Gram negativo aeróbios obrigatórios, a forma infeciosa é móvel e a água é o seu ambiente natural. É o agente causador da doença dos legionários em humanos, que é uma forma de pneumonia grave.

Utiliza-se a técnica de imunofluorescência direta (FIA) para a deteção qualitativa de antigénio de *S. penumoniae* e de antigénio de *L. pneumophila* do serogrupo 1, 3, 4 e 6 em amostras de urina de paciente com sintomas de pneumonia. Um resultado negativo não exclui a infeção por estas bactérias. A amostra de urina do doente é adicionada a uma cassete de teste, que é escolhida conforme o tipo de antigénio que se quer pesquisar. A cassete é colocada no analisador Sofia® que irá cronometrar automaticamente o tempo de desenvolvimento do teste (10 min), fazer a leitura e apresentar o resultado. Quando a amostra migra ao longo da tira até à linha de Teste, o complexo antigénio-conjugado liga-se ao anticorpo de captura, formando uma linha fluorescente. Se não existirem antigénios, as micropartículas fluorescentes não serão retidas pelos anticorpos capturados nem detetadas pelo analisador. (Usonis *et al.*, 2015)(Helbig *et al.*, 1997)

Pesquisa de Vírus Influenza

A gripe, infeção do trato respiratório, causada pelo vírus influenza tipo A, B ou C é responsável por epidemias sazonais, podendo ser transmitida através do ar (tosse, espirros). A pneumonia pode desenvolver-se como uma complicação da gripe, causando um aumento da morbilidade e mortalidade em certas populações (crianças, idosos e imunocomprometidos). O vírus influenza tipo A é o mais comum em seres humanos e tem a capacidade de causar pandemias e divide-se em subtipos de acordo com as 2 proteínas de superfície: a hemaglutinina (H) e a neuraminidase (N). Em 2009 identificou-se uma nova estirpe em seres humanos, o H1N1, que surgiu no México.

É um ensaio RT-PCR automatizado, múltiplo em tempo real destinado à deteção e diferenciação qualitativa *in vitro* do RNA dos vírus da gripe A, gripe B e subtipo H1N1 2009 da gripe A. O ensaio Xpert Flu é executado no equipamento GeneXpert®, já referido anteriormente. As amostras usadas podem ser: lavagens ou aspirados nasais e zaragatoas nasofaríngeas colhidas de pacientes com sinais e sintomas de infeção respiratória. Este sistema integra o processamento/lise de amostras, a purificação, a amplificação de ácidos nucleicos e a deteção da sequência-alvo.

Os resultados são interpretados pelo sistema através da medição de sinais fluorescentes, e podem ser: positivo/negativo (influenza A ou B) ou detetado/não detetado (subtipo H1N1). Pode haver positividade só para gripe A, com deteção ou não do subtipo H1N1, positividade apenas para gripe B, positividade para gripe A e gripe B (infeção mista rara) ou ser negativo para ambos os tipos. Quando não é detetado RNA do vírus A ou B, mas há deteção do subtipo H1N1, o teste é considerado inválido e deve ser repetido. Os resultados negativos não excluem a infeção por vírus da gripe. (Petric, Comanor e Petti, 2006)

Pesquisa de Vírus em crianças

Os vírus respiratórios Sincicial, Influenza A e B, Parainfluenza 1, 2, 3, o Adenovírus e o Metapneumovírus humano são responsáveis por infeções respiratórias frequentes, que podem ser graves nas crianças, idosos e imunodeprimidos. No Laboratório de Microbiologia do SPC a pesquisa destes vírus é maioritariamente feita em crianças com sintomas clínicos característicos de pneumonia.

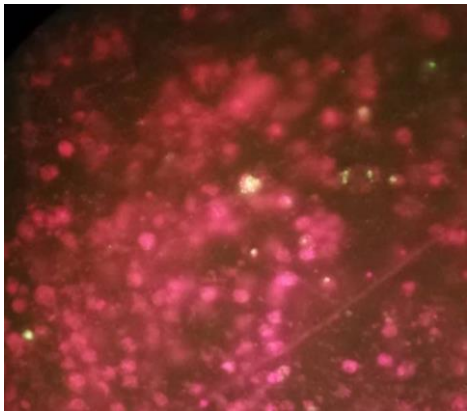

Figura 38: Células infetadas com Metapneumovírus, utilizando a técnica de imunofluorescência direta para observação da fluorescência.
(Fonte: Laboratório de Microbiologia do SPC do CHL)

As amostras usadas são: secreções nasais ou traqueobrônquicas. A colheita deve ser efetuada durante a fase máxima de libertação do vírus, isto é, logo após o início dos sintomas.

São determinados por imunofluorescência direta diretamente nas amostras dos doentes, o que permite realizar um diagnóstico rápido, simples e eficaz. São utilizados anticorpos monoclonais específicos de cada vírus que se ligam aos antigénios expressos nas células infetadas. Quando ocorre essa ligação as células infetadas aparecem fluorescentes na

observação ao microscópio de fluorescência (luz ultravioleta), como se pode ver na Figura 38. Esta fluorescência deve-se à ligação de anticorpos marcados com fluorocromos que têm especificidade para o complexo antigénio viral-anticorpo monoclonal. (Pothier *et al.*, 1985)

5.1.5 Líquido cefalorraquidiano (LCR)

As infeções do sistema nervoso central são raras, mas quando acontecem são associadas a elevada morbilidade e mortalidade, se o diagnóstico etiológico for retardado. Os microrganismos podem entrar no SNC atravessando uma barreira mucosa na corrente sanguínea passando de seguida pela barreira hematoencefálica, através de um traumatismo, pelas vias respiratórias e auditivas ou pelos nervos periféricos. (Murray, 2010)(Miller *et al.*, 2018)

O LCR protege o tecido cerebral e a espinal medula e é um líquido claro e estéril. É suscetível à infeção por bactérias, fungos, vírus ou parasitas. Estes microrganismos podem provocar: meningite (inflamação das meninges); encefalite (inflamação do cérebro); mielite (inflamação da espinal medula). (Zimmer, Burke e Bloch, 2016)

Os agentes etológicos mais comuns da meningite são *S. pneumoniae* (adultos), *Neisseria meningitidis* (crianças), *Haemophilus influenzae* (crianças) e Enterovírus. Enquanto na meningite bacteriana aguda há febre elevada e um rápido declínio no estado neurológico, na meningite viral aguda os sintomas ocorrem passado alguns dias e pode haver manifestações extraneuronais. A meningite crónica afeta indivíduos imunodeprimidos e pode ser provocada por fungos (ex: *Cryptococcus neoformans*), micobactérias ou espiroquetas. (Zimmer, Burke e Bloch, 2016)

A encefalite é originada maioritariamente por vírus e pode apresentar como manifestações clínicas febre, défices neurológicos focais (motores e sensoriais) e convulsões. (Zimmer, Burke e Bloch, 2016)

a. Colheita

A colheita é feita por punção lombar, antes do início da terapêutica antimicrobiana. Deve-se efetuar uma assepsia da pele do paciente antes da punção e o LCR deve ser colocado num tubo estéril de fundo cónico para concentração do produto, uma vez que pode conter poucos microrganismos.

Deve ser imediatamente enviado ao laboratório e mantido à temperatura ambiente, nunca deve ser refrigerado antes do processamento, a não ser que sejam pedidos estudos virais.

Para cultura bacteriana é necessário no mínimo 1mL, para cultura de fungos 2mL e para cultura de micobactérias 3mL. (Fonseca *et al.*, 2004)

b. Processamento laboratorial/Interpretação de resultados

O diagnóstico laboratorial é uma urgência que requer processamento imediato do LCR para determinar o agente etiológico e iniciar a terapia o mais rápido possível. (Fonseca *et al.*, 2004)

O aspeto macroscópico do líquido deve ser tido em atenção, uma vez que se se apresentar turvo é muito provável que contenha bactérias. Se estiver límpido pode conter vírus.

Pesquisa de Bactérias, micobactérias e fungos

Primeiro deve ser realizada uma centrifugação (2000g durante 15min.), com o intuito de concentrar os microrganismos num pequeno volume. Depois de obter um sedimento, prepara-se um esfregaço e cora-se pela técnica de Gram (bactérias e fungos) ou pela técnica de Ziehl Neelsen (micobactérias). Ao observar qualquer um dos esfregaços, se tiver um resultado positivo dever ser comunicado imediatamente ao clínico. No Gram deve-se examinar o tipo de morfologia das bactérias e a quantificação de leucócitos, pois quantos mais leucócitos tiver melhor é o prognóstico. Se se observar diplococos de Gram negativo intracelulares de leucócitos é muito provável que seja a *N. meningitidis*. Se a infeção for provocada por fungos, estes também são visíveis no Gram. Ao observar o Ziehl a pesquisa é feita como na expetoração, falada anteriormente, ou seja, procurando bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR). (Fonseca *et al.*, 2004)

Para além dos esfregaços, também se fazem culturas com o sedimento obtido em gelose sangue e chocolate (para bactérias). Estes meios são incubados a 37°C durante 4 dias, no entanto todos os dias são feitas leituras das placas. Assim que houver algum crescimento, dependendo do tipo de colónia fazem-se alguns testes rápidos, já falados anteriormente, com

o objetivo de uma identificação preliminar. Depois são escolhidas as cartas apropriadas para identificação e realização do antibiograma no VITEK® 2. (Fonseca *et al.*, 2004)

Se o médico pedir a pesquisa de micobactérias o procedimento é muito similar ao realizado para as expetorações, diferindo apenas no processo da descontaminação, pois como o LCR é estéril esta etapa não será necessária. O LCR é inoculado diretamente nos frascos BACT/ALERT MP (tampa vermelha), adiciona-se o líquido de reconstituição, que contém os componentes necessários para o crescimento das micobactérias e é são colocados no equipamento BACT/ALERT® 3D durante 42 dias. (Thorpe *et al.*, 1990)

Para a pesquisa de fungos, pode-se inocular o sedimento em frascos BACT/ALERT FA, os mesmos utilizados para as hemoculturas (tampa verde). Estes frascos permitem o crescimento de microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos (bactérias e fungos). No entanto se estiverem presentes fungos no LCR, também é observável o seu crescimento em gelose de sangue. (Thorpe *et al.*, 1990)

Pesquisa de Enterovírus

Os Enterovírus causam muitas infeções e muitas das vezes são transmitidos por contacto direto com secreções respiratórias de um indivíduo infetado. As pessoas infetadas manifestam febre, dor de cabeça, rigidez do pescoço, fotofobia, sonolência e náuseas.

No Laboratório de Microbiologia do SPC esta pesquisa é realizada por RT-PCR em tempo real automatizado para a deteção qualitativa *in vitro* de RNA do Enterovírus (EV) em amostras de LCR de indivíduos com sinais e sintomas de meningite ou meningoencefatile. O ensaio Xpert Flu é executado no equipamento GeneXpert®, e integra a purificação de amostras, a amplificação de ácidos nucleicos e a deteção da sequência-alvo.

Os resultados positivos para EV não descartam a hipótese de outras causas de meningite como bactérias, micobactérias, fungos ou outros vírus e por isto deve ser apenas usado como um adjuvante de outras informações clínicas. (Versolovic *et al.*, 2011)

5.1.6 Exsudados genitais

As infeções geniturinárias podem ser causadas por transmissão sexual de microrganismos patogénicos, por desequilíbrios na microbiota normal ou por fungos. (Baron *et al.*, 2013)

Os agentes patogénicos que causam doenças sexualmente transmissíveis são: bactérias (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Haemophilus ducreyi*); parasitas (*Trichomonas vaginalis*) e vírus (Vírus Herpes Simplex – HSV; Vírus do Papiloma Humano – HPV; Vírus da Imunodeficiência Humana – HIV). (Baron *et al.*, 2013)

O desequilíbrio na flora normal acontece quando há uma mudança na população microbiana comensal. Na mulher é denominada vaginose bacteriana e é caracterizada pela redução de Lactobacilos produtores de peróxido de hidrogénio e aumento de *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma*, etc. No homem encontram-se poucos microrganismos, tais como: estafilococos, micrococos e estreptococos alfa hemolíticos. (Baron *et al.*, 2013)

As infeções causadas por fungos são denominadas Candidíase, uma vez que em 90% das mulheres é causada por um sobrecrescimento de *Candida albicans*, as restantes surgem devido a outras espécies de *Candida* sp. (*C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*). A identificação de *Candida* num exame cultural de uma mulher assintomática não deve ser tratada, pois cerca de 10 a 20% das mulheres têm fungos comensais na vagina. (Sociedade Portuguesa de Ginecologia, 2012)

a. Colheita

A determinação de amostras apropriadas para o diagnóstico de infeções geniturinárias depende do local de infeção e dos microrganismos. Podem ser exsudados vaginais, uretrais, rectais, úlceras genitais, etc.

Nos exsudados vaginais é utilizado o espéculo, e o exsudado é colhido do fundo de saco posterior e/ou paredes vaginais (2 zaragatoas). Os uretrais devem ser realizados antes da 1ªmicção, com uma zaragatoa fina e uma 2ª zaragatoa deve ser colocada em meio de transporte com carvão (neutraliza os metabolitos tóxicos, melhorando a sobrevivência do gonococo). A zaragatoa rectal deve ser introduzida através do esfíncter anal e aguardar 10 a 30seg para fixar os microrganismos, devendo-se evitar o contacto com matéria fecal. Esta é também colocada em meio de transporte com carvão, que deve ser mantida à temperatura ambiente. No caso

das úlceras, deve-se pressionar a base da lesão e colher o fluído claro com uma pipeta de Pasteur ou com uma zaragatoa embebida em solução salina. (Fonseca *et al.*, 2004)

b. Processamento laboratorial/Interpretação de resultados

Exsudado vaginal

Figura 39: Exame a fresco de trofozoíto de *Trichomonas vaginalis*. Fonte: (Raymondo, 1999)

Por rotina são pesquisadas bactérias, fungos e parasitas. Para tal é realizado um exame direto a fresco para observar a presença ou não de *Trichomonas vaginalis*, protozoário flagelado que apresenta movimento quando observado ao microscópio (Figura 39). É também realizada uma coloração de Gram, onde devem ser pesquisadas leveduras e descrita a flora tendo em atenção a predominância ou não de algum tipo de bactéria. (Fonseca *et al.*, 2004)(Raymondo, 1999)

De seguida deve ser semeado em gelose de sangue, gelose de chocolate, gelose granada (identificação direta de *Streptococcus agalactiae*, em mulheres grávidas) e gelose chromID Candida (identificação da espécie *Candida albicans*). A incubação é feita a 37°C durante 48 horas, no entanto a 1ª leitura é realizada às 24 horas.

A valorização clínica das culturas é efetuada de acordo com a informação clínica e o exame direto.

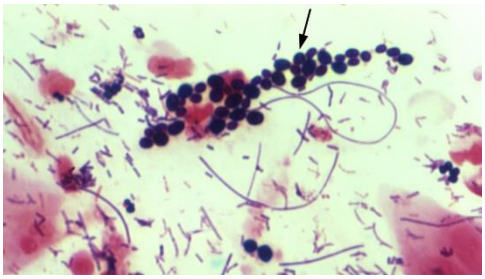

Figura 40: Coloração de Gram de um exsudado vaginal com leveduras. Fonte: (Kinney e Spach, 2017)

Se se observarem colónias azuis na gelose CAN e leveduras no Gram (Figura 40), podemos estar na presença de uma Candidíase provocada por *Candida albicans*.

Quando é observado, a fresco, o trofozoíto de *Trichomonas vaginalis* é uma Tricomoníase.

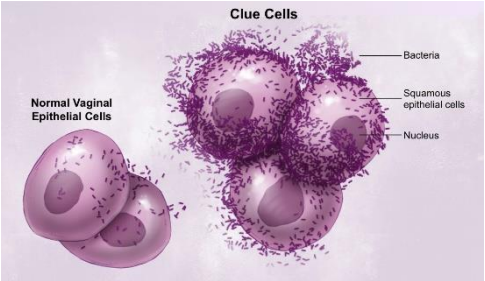

Figura 41: "Clue cells" vs. Células epiteliais vaginais normais.
Fonte: (Kinney e Spach, 2017)

Numa Vaginose bacteriana devem ser observadas "clue cells" (Figura 41), na coloração de Gram e normalmente há uma diminuição de bacilos de Gram postivo (Lactobacilos) e um aumento de bactérias de Gram negativo. (Fonseca *et al.*, 2004)

A presença de *Streptococcus agalactiae* só é valorizada em grávidas. A gelose granada permite a deteção e identificação direta de *S. agalactiae* produzindo colónias com um pigmento cor de laranja.

Exsudado uretral e retal

Nestes exsudados podem ser pesquisadas *Neisseria gonorrhoae* e *Chlamydia trachomatis* tanto no homem como na mulher. *N. gonorrhoae* e *C. trachomatis* na mulher, podem infetar o colo uterino, por isto poderá ser necessário realizar um esfregaço endocervical.

C. trachomatis é uma bactéria de Gram negativo intracelular obrigatória de células eucarióticas, devido à sua incapacidade de sintetizar ATP. Existem 15 serotipos que podem provocar doenças em humanos, sendo os serotipos de D a K a principal causa de infeções genitais em homens e mulheres. Nas mulheres esta bactéria pode levar a infertilidade. *N. gonorrhoae* é uma bactéria em forma de diplococo de Gram negativo, intracelular de leucócitos facultativa e causa a gonorreia. A maioria das infeções uretrais nos homens originam sintomas que os levam à procura de tratamento, mas nas mulheres as infeções são frequentemente assintomáticas. *N. gonorrhoae*, se presente em mulheres grávidas, pode passar para o bebé na altura do parto e causar uma conjuntivite.

No Laboratório de Microbiologia do SPC esta pesquisa é realizada por PCR em tempo real qualitativo in vitro para a deteção e diferenciação automática de DNA de *C. trachomatis* (CT) e/ou *N. gonorrhoae* (NG) em amostras de indivíduos assintomáticos e sintomáticos. Estas bactérias também podem ser pesquisadas na urina. O ensaio Xpert CT/NG é executado no equipamento GeneXpert®, e integra a purificação de amostras, a amplificação de ácidos nucleicos e a deteção da sequência-alvo. Para CT é detetado um alvo, o CT1 e para NG são detetados 2 alvos, NG2 e NG4. Ambos os alvos de NG têm de ser positivos para o ensaio indicar um resultado positivo para NG. (Workowski e Berman, 2006)

Úlceras genitais

Podem ser causadas por *Treponema pallidum* e *Haemophilus ducreyi*. O *T. pallidum* é o agente etiológico da sífilis e o *H. ducreyi* provoca cancroide.

T. pallidum é uma espiroqueta de Gram negativo, tem forma helicoidal e é móvel. No entanto não cora pela coloração de Gram e não cresce *in vitro*, por isso o seu diagnóstico laboratorial é um pouco diferente. Pode ser observado ao microscópio de campo escuro imediatamente após a colheita (morre quando exposto ao ar) ou através de testes serológicos. (Baron *et al.*, 2013)

H. ducreyi é um cocobacilo de Gram negativo, cresce lentamente em gelose chocolate e necessita apenas do fator X (hemina). (Baron *et al.*, 2013)

Amostra cervival para pesquisa de HPV

A infeção persistente pelo HPV de alto risco é a principal causa de cancro do colo do útero. É um pequeno vírus não encapsulado, com DNA de cadeia dupla. Existem mais de 150 serotipos diferentes de HPV, mas apenas 14 são considerados de alto risco para o desenvolvimento de cancro. Dados recentes sugerem que os serotipo de HPV 16, 18 e 45 estão associados a cerca de 80% de todos os cancros invasivos do colo uterino e por isto os testes de rastreio devem ser específicos para estes serotipos.

O ensaio Xpert HPV é um teste qualitativo *in vitro* realizado no equipamento GeneXpert® que deteta a região E6/E7 do genoma de DNA viral do Vírus do Papiloma Humano (HPV). O teste realiza a amplificação do DNA alvo por reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real de 14 serotipos de HPV. Identifica os serotipos HPV 16 e HPV 18/45 especificamente e os restantes 11 são agrupados no mesmo resultado (31, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68). As amostras usadas são células cervicais colhidas em solução PreservCyt®. É também feito um contro de adequação da amostra que deteta a presença de uma cópia do gene humano e verifica se a amostra tem um número adequado de células humanas.

Os resultados são interpretados pelo sistema através da medição de sinais fluorescentes e podem ser: negativo para todos os serotipos; positivo para todos os serotipos ou positivo só para um serotipo específico. (Sanjose, de *et al.*, 2010)

5.2 Identificação de microrganismos

Depois de efetuado o processamento laboratorial para cada produto biológico, é necessário fazer uma identificação definitiva dos microrganismos presentes nas amostras. Ao observar a coloração de Gram, o aspeto das colónias, o tipo de amostra, a técnica de colheita e as características do paciente, o Técnico valoriza ou não o microrganismo em questão, uma vez que pode haver crescimento de agentes não patogénicos, comensais da flora normal do Homem. Quando valorizados são identificados de forma preliminar usando testes bioquímicos rápidos (referenciados nos Anexos). A identificação preliminar ajuda na escolha da carta apropriada para identificação definitiva no equipamento VITEK® 2.

O VITEK® 2 é um sistema automatizado que identifica um microrganismo utilizando uma base de dados de estirpes e respetivas características bioquímicas conhecidas. Utiliza cartas com diferentes poços, em cada poço há substratos diferentes para a realização de testes bioquímicos. Um sistema ótico de transmissão permite a interpretação das reações usando diferentes comprimentos de onda no espetro visível. Durante a incubação, é medida a turbidez ou os produtos coloridos do metabolismo dos substratos. Os resultados dos diferentes testes bioquímicos são depois comparados com a extensa base de dados e é apresentado um valor em percentagem relacionado com a forma como as reações observadas se comparam às reações típicas de cada microrganismo.

As cartas de reagentes utilizadas para identificação dos diferentes microrganismos são:

- GP – Carta de identificação de Gram-Positivos;
- GN – Carta de identificação de Gram-Negativos fermentadores e não-fermentadores;
- ANC – Carta de identificação de Bactérias Anaeróbias e Corinebactérias;
- YST – Carta de identificação de leveduras.

Inicia-se este procedimento com a preparação de uma suspensão de microrganismo homogénea em solução salina estéril (NaCl) a partir de uma colónia isolada. A densidade deve ser equivalente a um padrão McFarland 0,50 a 0,63 para bactérias e 1,80 a 2,20 para fungos, utilizando um VITEK®2DensiCHEK™ calibrado. Sempre que se faz uma suspensão é realizado um teste de pureza, fazendo uma repicagem do microrganismo em suspensão para se certificar de que foi utilizada uma colónia pura. Esta repicagem é feita para CLED quando a amostra é urina, enquanto nos outros produtos biológicos é realizada em gelose de sangue. De seguida

a suspensão e carta apropriada são colocadas numa cassete e entram no equipamento para a realização dos diferentes testes e identificação. (Pincus, 2010)

5.3 Antibiograma

O Antibiograma ou TSA (Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos) faz-se sempre que é isolado um microrganismo patogénico responsável por uma infeção que necessite de terapêutica antimicrobiana. Os resultados deste teste são muito importantes para a escolha correta do antimicrobiano ativo contra o organismo infetante. No entanto, o resultado do tratamento no paciente é influenciado por vários fatores, como as propriedades farmacocinéticas, a toxicidade do fármaco, a doença clínica e o estado geral do paciente, e por isto os organismos que *in vitro* são sensíveis a um antibiótico, quando administrados ao paciente podem ter um comportamento diferente e apresentar resistência. (Murray, 2010)(Fonseca *et al.*, 2004)

No Laboratório de Microbiologia do SPC o Antibiograma é realizado de forma automática no VITEK® 2 ou de forma manual utilizando galerias como no caso do *H. influenzae*, já explicado anteriormente. Este teste de suscetibilidade é feito em paralelo com a identificação microbiana, uma vez que ambos se processam no mesmo equipamento.

A carta TSA é uma metodologia de teste automatizada baseada na técnica da concentração mínima inibitória (CMI), que usa concentrações de antibiótico derivadas de diluições duplas sucessivas. A CMI é então determinada a partir da concentração mais baixa em que ocorre inibição do crescimento, apresentando o resultado como sensível, intermédio, ou resistente. Cada carta de TSA contém um poço de controlo com meio de cultura microbiológico, os restantes micropoços têm quantidades conhecidas de um antibiótico específico combinado com um meio de cultura. Depois de preparada a suspensão microbiana e colocada a carta de identificação na cassete, deve ser colocado um tubo vazio, local onde o equipamento irá fazer a diluição automática para preparar um inóculo adequado para a carta de sensibilidade. O aparelho monitoriza o crescimento em cada um dos poços da carta durante um período de tempo definido e no final do ciclo de incubação, os valores de CMI são determinados para cada antibiótico contido na carta através da medição da turbidimetria. O crescimento de microrganismos na presença de antibióticos é avaliado em relação ao crescimento no poço de controlo. (Jorgensen e Ferraro, 2009)

As cartas TSA utilizadas no Laboratório de Microbiologia do SPC do CHL são:

- AST-N355: Determinação da sensibilidade de bacilos de Gram Negativo aeróbios fermentadores (Enterobactérias);
- AST-N373: Determinação da sensibilidade de bacilos de Gram Negativo aeróbios não fermentadores (*Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp.);
- AST-P648: Determinação da sensibilidade de cocos de Gram Positivo (*Staphylococcus* spp.);
- AST-P586: Determinação da sensibilidade de cocos de Gram Positivo (*Enterococcus* spp. e *S.agalactiae*);
- AST-ST03: Determinação da sensibilidade de cocos de Gram Positivo (*S. pneumoniae*, *S. pyogenes* e Streptococcus viridans);
- AST-YS08: Determinação da sensibilidade de leveduras.

Depois de observados os resultados do antibiograma, examinam-se as repicagens feitas aquando da realização da suspensão microbiana. Se a cultura estiver pura o resultado é enviado, se não o antibiograma é realizado novamente, pois a suspensão poderá ter mais que um microrganismo e os resultados não são fiáveis.

Existem outros testes de pesquisa de resistências a antibióticos que muitas vezes são pedidos pelo médico, e que são realizados diretamente numa amostra sem o tratamento prévio de cultivo e identificação do microrganismo. Estes testes são realizados em indivíduos hospitalizados com ou sem infeções nosocomiais e auxiliam na prevenção e controlo da disseminação de doenças de difícil tratamento no meio hospitalar. O Laboratório de Microbiologia do SPC realiza frequentemente por biologia molecular a pesquisa de MRSA e KPC.

MRSA (*Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina)

O *Staphylococcus aureus* é um importante agente patogénico que pode ser responsável por bacteriemia, pneumonia, osteomielite, endocardite aguda, síndrome de choque tóxico, intoxicação alimentar, síndrome da pele escaldada, etc.

Antigamente o antibiótico usado para o tratamento de infeções por *S. aureus* era a penicilina, até que a aquisição e propagação de plasmídeos codificadores de beta-lactamases prejudicou a sua eficácia. Depois foi introduzida a meticilina, uma penicilina semissintética, à qual algumas estirpes se tornaram também resistentes. Esta resistência deve-se a um complexo

de gene *mec* presente em *S. aureus*, que contém o gene *mecA* ou *mecC*, denominado cassete cromossómica estafilocócica.

O teste Xpert MRSA é um teste qualitativo para diagnóstico *in vitro* que se destina à deteção de DNA de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) diretamente a partir de zaragatoas nasais em pacientes com risco de colonização nasal. O teste utiliza a reação em cadeia de polimerase (PCR) automática em tempo real para a amplificação dos genes alvo (*mecA* e *mecC*) e sondas de hibridação fluorogénicas especificas para a deteção desses mesmos genes, através do sistema GeneXpert®.

Este teste destina-se a ajudar na prevenção e no controlo de infeções por MRSA e não ao seu diagnóstico. Um resultado negativo não exclui a colonização nasal por MRSA, sendo por isso necessária uma cultura para tipagem epidemiológica ou testes de suscetibilidade suplementares. (Shopsin e Kreiswirth, 2001)

KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase)

As carbapenemases foram encontradas pela primeira vez em *Klebsiella pneumoniae*, daí a denominação KPC, mas hoje em dia já foram descritas em outras espécies de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. Por isto estas bactérias têm vindo a adquirir resistência a carbapenemos, uma classe de antibióticos beta-lactâmicos de largo espetro frequentemente usados como último recurso no tratamento de infeções hospitalares. O grupo KPC tem um alto potencial de disseminação devido à sua localização em plasmídeos, o que permite que as bactérias transfiram os genes de resistência entre si, que dificulta o controlo de epidemias e torna extremamente difícil o tratamento destas infeções.

O ensaio Xpert Carba-R é um teste de diagnóstico *in vitro* qualitativo concebido para a deteção e diferenciação das sequências dos genes bla_{KPC}, bla_{NMD}, bla_{VIM}, bla_{OXA-48} e bla_{IMP-1} associados à resistência a carbapenemos em bactérias de Gram negativo obtidas a partir de zaragatoas retais em doentes com risco de colonização intestinal com este tipo de bactérias. A técnica utilizada é PCR em tempo real no sistema GeneXpert®, como na pesquisa de MRSA.

Este método rápido e rigoroso para o rastreio de doentes relativamente à colonização com bactérias resistentes a carbapenemos facilita o controlo de infeções por estas bactérias em hospitais. Este não se destina a monitorizar o tratamento de infeções bacterianas resistentes a carbapenemos, para tal são necessárias culturas e testes de suscetibilidade antimicrobiana. (Nordmann e Cornaglia, 2012)

VI. Conclusão

Quando me candidatei ao Mestrado em Análises Clínicas não tinha a certeza do que queria para o meu futuro. Sendo Bioquímica, sempre gostei da área das Ciências da Saúde, no entanto quando pensava numa profissão parecia que nada englobava tudo o que gostava. Quando ouvi falar deste mestrado fiquei muito interessada. As aulas são realmente muito interessantes, e todos os temas abordados são importantíssimos saberes para um Técnico Superior de Saúde. O que mais me fascina nesta área é a interdependência de todas as valências, nada deve ser avaliado por si só, já que o nosso organismo também funciona como um todo.

Este estágio curricular foi sem dúvida a melhor experiência laboratorial que podia ter tido e deu-me a certeza que é num laboratório de Análises Clínicas que quero trabalhar. O facto de ter sido realizado em dois ambientes distintos, o ambulatório e o hospitalar, deu-me a oportunidade de contactar com metodologias diferentes, profissionais de saúde com opiniões distintas e perceber algumas diferenças que existem entre os dois meios, todavia no final o importante é a realização de um trabalho rigoroso para a prestação do melhor serviço ao utente e/ou paciente.

Para além da consolidação dos conhecimentos adquiridos ao longo do curso, tive a oportunidade de adquirir competências técnicas na fase pré-analítica, que considero de extrema importância, pois um bom profissional deve saber o procedimento completo, desde a colheita, até à interpretação de resultados. E é com orgulho que digo, que de momento tenho a felicidade de executar colheitas no laboratório Beatriz Godinho, significando para mim o primeiro passo para a construção de uma futura carreira nas Análises Clínicas.

Um dos meus receios era a troca de laboratório a meio do estágio, uma vez que tinha sido muito bem integrada no primeiro e tal poderia não acontecer no segundo. No entanto, posso dizer que adorei ambos e não consigo escolher uma preferência. Sempre me foi dada a oportunidade de expressar a minha opinião, era questionada sobre as metodologias que iam sendo realizadas, se algo não fosse do meu conhecimento era-me prontamente explicado e era continuamente incentivada a participar ativamente no trabalho do dia-a-dia.

Sei que sem este Mestrado nada disto seria possível e estou muito grata por tudo o que aprendi e experienciei. Este relatório é o culminar de todo o trabalho desenvolvido e com ele a aproximação do final de uma etapa muito trabalhosa, mas que me deixa com um sentimento de dever cumprido e realização pessoal.

VII. Referências

ALMEIDA, M.; MELO, C.; ALMEIDA, M. - Causas de alterações morfológicas nos glóbulos vermelhos que comprometem o resultado do laudo clínico. **Facene/Famene**. 10:1 (2012) 83–90.

AMALARADJOU, M.; VENKITANARAYANAN, K. - Natural Approaches for Controlling Urinary Tract Infections. Em TENKE, DR. PETER (Ed.) - **Urinary Tract Infections**. Rijeka : InTech, 2011. ISBN 978-953-307-757-4. p. 360.

BAGNESS, C. - **Leukemia: A Research Report**. Pensilvânia : DIANE Publishing, 1993. ISBN 0788171895.

BAIN, B. - **Blood cells: A practical guide**. 4. ed. Oxford : John Wiley & Sons, 2008. ISBN 9781405142656.

BAIN, B. - **Células Sanguíneas: Um Gia Prático**. 5. ed. Porto Alegre : Artmed Editora, 2016. ISBN 8582713312.

BARON, E. *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). **Clinical Infectious Diseases**. . ISSN 1058-4838. 57:4 (2013) e22–e121.

BARONE, A.; FERNANDES, A. - **Hemograma** [Em linha] [Consult. 14 mai. 2018]. Disponível em WWW:<URL:http://www.profbio.com.br/aulas/hemato1_05.pdf>.

BATISTA, G. - **Um bom estiraço sanguíneo** [Em linha], atual. 2012. [Consult. 24 mai. 2018]. Disponível em WWW:<URL:http://biomedicoscopia.blogspot.com/2012/06/um-bom-estiraco-sanguineo.html>.

BIOMÉRIEUX - **Meio de Cultura BacT/ALERT®** [Em linha], atual. 2011. [Consult. 10 ago. 2018]. Disponível em WWW:<URL:http://www.biomerieux.com.br/produto/meio-de-cultura-bactalertr>.

BIOTEC, C. - **ONE STEP Clostridium difficile antigen GDH, Toxin A and Toxin B COMBO CARD TEST** [Em linha]. Zaragoza (SPAIN) : [s.n.], atual. 2013. [Consult. 16 ago. 2018]. Disponível em WWW:<URL:http://www.diachel.gr/files/products/IU-GX87V rev.00.pdf>.

BRUEGEL, M. *et al.* - Comparison of five automated hematology analyzers in a university hospital setting: Abbott Cell-Dyn Sapphire, Beckman Coulter DxH 800, Siemens Advia 2120i, Sysmex XE-5000, and Sysmex XN-2000. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. . ISSN 14374331. 53:7 (2015) 1057–1071.

BUIJTELS, P.; PETIT, P. - Comparison of NaOH-N-acetyl cysteine and sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens. **Journal of Microbiological Methods**. . ISSN 01677012. 62:1 (2005) 83–88.

BURTIS, C.; BRUNS, D. - **Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry**. 6. ed. Lubbock, Texas : Elsevier Health Sciences, 2001. ISBN 9780721638652.

CADERNODEFARMÁCIA - **Mielopoiese** [Em linha], atual. 2012. [Consult. 28 mai. 2018]. Disponível em WWW:<URL:http://cadernodefarmacia.blogspot.com/2012/11/mielopoiese.html>.

CAMPOS, A. - **Diagnóstico da Tuberculose** [Em linha], atual. 2014. [Consult. 3 ago. 2018]. Disponível em WWW:<URL:https://pt.slideshare.net/Douglasliciocampos/curso-tuberculose-hansenase-e-sfilis-novo-35904161>.

CENAPRO - **Contadores hematológicos automatizados** [Em linha], atual. 2015. [Consult. 18 mai. 2018]. Disponível em WWW:<URL:http://www.cenapro.com.br/noticias-detalhes.asp?codigo=332>.

CHL - **Notícias e Eventos, CHL conquista acreditação integral da JCI pelos cuidados de saúde de qualidade** [Em linha], atual. 2017. [Consult. 30 ago. 2018]. Disponível em WWW:<URL:www.chleiria.pt/comunicacao-social/noticias-eventos/-/chl-conquista-acreditacao-integral-da-jci-pelos-cuidados-de-saude-de-qualidade-234/>.

DGS - **Norma nº 033/2011: Prescrição e Determinação da Hemoglobina Glicada A1c** [Em linha], atual. 2012. [Consult. 15 mai. 2018]. Disponível em WWW:<URL:https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:Tn_vQ6VcWmoJ:https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0332011-de-30092011-atualizada-a-06122012-jpg.aspx+&cd=1&hl=pt-PT&ct=clnk&gl=pt>.

DIREÇÃO GERAL DA SAÚDE - **Norma nº 063/2011: Prescrição e determinação do hemograma** [Em linha], atual. 2013. [Consult. 25 mai. 2018]. Disponível em WWW:<URL:https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:grcOGT1B42MJ:https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0632011-de-30122011-atualizada-a-12092013-png.aspx+&cd=1&hl=pt-PT&ct=clnk&gl=pt>.

EUCAST - **Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie** [Em linha], atual. 2017. [Consult. 20 ago. 2018]. Disponível em WWW:<URL:http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFMV1_0_MARS_2017.pdf>.

FERNANDES, F. *et al.* - Valor da biópsia de pericárdio no diagnóstico etiológico das pericardiopatias. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. . ISSN 0066-782X. 70:6 (1998) 393–395.

FONSECA, A. *et al.* - **Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia** [Em linha], atual. 2004. [Consult. 2 ago. 2018]. Disponível em WWW:<URL:https://www.dgs.pt/programa-nacional-de-controlo-da-infeccao/documentos/manuais-de-boas-praticas/orientacoes-para-a-elaboracao-de-um-manual-de-boas-praticas-em-bacteriologia.aspx>.

FÓRUM INTERNACIONAL DE SOCIADADES RESPIRATÓRIAS - O Impacto Global da Doença Respiratória. **European Respiratory Society**. 2017) 1–45.

GEORGE, F. - Abordagem Diagnóstica e Terapêutica das Parasitoses em Idade Pediátrica. **Norma Da Direção-Geral Da Saúde**. . ISSN 00029378. 1:1 (2017) 9.

GILLIGAN, P.; SHAPIRO, D.; SMILEY, M. - Gastrointestinal Tract Infections. Em **Cases in Medical Microbiology and Infectious Diseases**. 3. ed. [S.l.] : American Society of Microbiology Press, 2003. ISBN 1555812074. p. 143–200.

GRABE, M. *et al.* - Orientações sobre Infecções Urológicas. **Associação Portuguesa de Urologia**. Tabela 1 (2009) 152–168.

GRIMONT, P.; WEILL, F. - Antigenic formulae of the Salmonella servovars. **WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella**. . ISSN 2356-6140. 2008) 1–167.

GROTTO, H.; NORONHA, J. - Identificação de células tronco hematopoiéticas: citometria de fluxo convencional versus contador hematológico automatizado. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. . ISSN 1516-8484. 25:3 (2003) 169–172.

HACHEM, R. *et al.* - Velocidade De Hemossedimentação (Vhs) Sem Diluição: Metodologia Confiável? **Visão Acadêmica**. . ISSN 1098-6596. 11:2 (2010) 67–74.

HELBIG, J. *et al.* - Antigenic lipopolysaccharide components of Legionella pneumophila recognized by monoclonal antibodies: Possibilities and limitations for division of the species into serogroups. **Journal of Clinical Microbiology**. . ISSN 00951137. 35:11 (1997) 2841–

2845.

HOFFBRAND, A.; MOSS, P. - **Fundamentos em Hematologia**. 6. ed. Porto Alegre : Artmed, 2012. ISBN 856585230.

HOFFBRAND, A.; MOSS, P. - **Fundamentos em Hematologia de Hoffbrand**. 7. ed. Porto Alegre : Artmed, 2018. ISBN 8582714513.

INSA - **Abordagem Laboratorial - Hemoglobinopatias** [Em linha], atual. 2009. [Consult. 24 mai. 2018]. Disponível em WWW:<URL:http://www2.insa.pt/sites/INSA/Portugues/ComInf/Noticias/Documents/2009/10_Outubro/DiaINSA09_DPS_AM.pdf>.

ISTOCK - **Gram-positiva e negativa Bactéria Gram - Ilustração em Alta Resolução** [Em linha], atual. 2018. [Consult. 3 ago. 2018]. Disponível em WWW:<URL: https://www.istockphoto.com/br/vetor/gram-positiva-e-negativa-bactéria-gram-gm518294121-49051886>.

JOHN, W. *et al.* - Multicentre evaluation of the Premier Hb9210 HbA1c analyser. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. . ISSN 14374331. 53:2 (2015) 319–327.

JORGENSEN, J.; FERRARO, M. - Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. **Clinical Infectious Diseases**. . ISSN 1058-4838. 49:11 (2009) 1749–1755.

KAS, M. *et al.* - Evaluation of a rapid immunochromatographic assay for the detection of rotavirus, norovirus and adenovirus from children hospitalized with acute watery diarrhea. **P N G Med J**. . ISSN 0031-1480. 56:3–4 (2013) 141–144.

KINNEY, R.; SPACH, D. - **Vaginitis** [Em linha], atual. 2017. [Consult. 28 ago. 2018]. Disponível em WWW:<URL:https://www.std.uw.edu/go/syndrome-based/vaginal-discharge/core-concept/all>.

MAGALHÃES, L. - **Hemoglobina** [Em linha], atual. 2011. [Consult. 29 mai. 2018]. Disponível em WWW:<URL:https://www.todamateria.com.br/hemoglobina/>.

MAKRIS, M.; GREAVES, M.; GUBERT, I. - **O sangue nas doenças sistêmicas**. Barueri : Manole, 1998. ISBN 8520407447.

MAZILI, P.; CARVALHO, A.; ALMEIDA, F. - Infecção do trato urinário. **Revista Brasileira de Medicina**. . ISSN 00347264. 68:12 (2011) 74–81.

MCMULLEN, A.; WILEN, C.; BURNHAM, C. - Epidemiology of Bloodstream Infections. Em

The Dark Art of Blood Cultures. Washington, DC : American Society of Microbiology Press, 2017. p. 163–181.

MEDICAL, TNT - **Aptio Automation** [Em linha], atual. 2006. Disponível em WWW:<URL:https://tntmedical.com.vn/en/san-pham/aptio-automation/>.

MILLER, M. *et al.* - A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiologya. **Clinical Infectious Diseases**. . ISSN 1058-4838. 67:6 (2018) e1–e94.

MIYAKE, C. - **Reticulócitos: da contagem manual à citometria de fluxo**. [S.l.] : Universidade Federal do Paraná, 2011

MONTEIRO, J. - ARTIGO DE REVISÃO INFECÇÕES NOSOCOMIAIS. Alguns Aspectos. **ACTA MEDICA PORTUGUESA**. 6:1993) 135–140.

MOURAD, S. *et al.* - **Fluxo específico na rotina laboratorial detecta e soluciona os casos de pseudoplaquetopenia** [Em linha], atual. 2011. [Consult. 23 mai. 2018]. Disponível em WWW:<URL:http://www.fleury.com.br/medicos/educacao-medica/revista-medica/materias/Pages/fluxo-especifico-na-rotina-laboratorial-detecta-e-soluciona-os-casos-de-pseudoplaquetopenia.aspx>.

MURRAY, D. - **Microbiologia Médica**. 6. ed. Brasil : Elsevier, 2010. ISBN 9780323054706.

NAOUM, P.; BONINI-DOMINGOS, C. - Dificuldades no diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias. **Rev. bras. hematol. hemoter**. . ISSN 1516-8484. 29:3 (2007) 226–228.

NAOUM, P.; NAOUM, F. - **Hematologia Laboratorial - Eritrócitos**. 2. ed. São José do Rio Preto : Academia de Ciência e Tecnologia (AC&T), 2008

NORDMANN, P.; CORNAGLIA, G. - Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: A call for action! **Clinical Microbiology and Infection**. . ISSN 14690691. 18:5 (2012) 411–412.

ORIONDIAGNOSTICA - **Uricult®Trio** [Em linha], atual. 2018. [Consult. 7 ago. 2018]. Disponível em WWW:<URL:http://www.oriondiagnostica.com/globalassets/documents-and-materials/uricult/132402_uricult_trio.pdf>.

PAIXÃO, L.; CASTRO, F. - Colonization of the intestinal microbiota and its influence on health host. **Universitas: Ciências da Saúde**. . ISSN 1981-9730. 14:1 (2016) 85–96.

PETERSON, Lance R. *et al.* - Laboratory testing for Clostridium difficile infection: Light at the

end of the tunnel. **American Journal of Clinical Pathology**. . ISSN 00029173. 136:3 (2011) 372–380.

PETRIC, M.; COMANOR, L.; PETTI, C. - Role of the laboratory in diagnosis of influenza during seasonal epidemics and potential pandemics. **J Infect Dis**. . ISSN 0022-1899. 194:2 (2006) 98–110.

PINCUS, D. - Microbial identification using the bioMérieux VITEK® 2 system. **Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods**. 2010) 1–32.

PLEBANI, M. *et al.* - The TEST 1 automated system: a new method for measuring the erythrocyte sedimentation rate. **American journal of clinical pathology**. 110:3 (1998) 334–340.

POTHIER, P. *et al.* - Monoclonal antibodies against respiratory syncytial virus and their use for rapid detection of virus in nasopharyngeal secretions. **Journal of Clinical Microbiology**. . ISSN 00951137. 21:2 (1985) 286–287.

RATTAN, Ashok; KALIA, Awdhesh; AHMAD, Nishat - Multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis: Molecular perspectives. **Emerging Infectious Diseases**. 4:2 (1998) 195–209.

RAYMONDO, D. - **Trichomonas vaginalis** [Em linha], atual. 1999. [Consult. 27 ago. 2018]. Disponível em WWW:<URL:http://www.practicalscience.com/tvag.html>.

RITA, M.; ARAUJO, E. - Hemoculturas-Recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados Coleta de hemoculturas. **J Infect Control**. 1:1 (2012) 8–19.

ROCHE - **Uricult®** [Em linha], atual. 2018. [Consult. 7 ago. 2018]. Disponível em WWW:<URL:https://www.roche.de/diagnostics/tests-parameter/point-of-care-diagnostik/uricult_uricult_plus.html#Merkmale>.

ROSSI, T. *et al.* - Interações entre Candida albicans e Hospedeiro. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**. 32:1 (2011) 15–28.

SAMANTHI - **Difference Between Myeloid and Lymphoid Cells** [Em linha], atual. 2017. [Consult. 3 mai. 2018]. Disponível em WWW:<URL:https://www.differencebetween.com/difference-between-myeloid-and-vs-lymphoid-cells/>.

SAMBOL, Susan P. *et al.* - Toxin Gene Analysis of a Variant Strain of Clostridium difficile That Causes Human Clinical Disease. **Infection and Immunity**. . ISSN 0019-9567. 68:10 (2000) 5480–5487.

SANJOSE, Silvia DE *et al.* - Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. **The Lancet Oncology**. . ISSN 14702045. 11:11 (2010) 1048–1056.

SANTOS, V.; CUNHA, S.; CUNHA, D. - Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações Método: princípios e fatores envolvidos. **Rev Ass Med Brasil**. . ISSN 01044230. 46:3 (2000) 232–6.

SHOPSIN, B.; KREISWIRTH, B. - Molecular epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Emerging Infectious Diseases**. . ISSN 10806040. 7:2 (2001) 323–326.

SIEMENS - ADVIA® 2120 Hematology Systems. **Operator´s Guide**. Tarrytown. 2010) 9–33.

SIEMENS HEALTH CARE DIAGNOSTICS INC. - **ADVIA 2120i Hematology System: Methods and Applications** [Em linha], atual. 2010. [Consult. 16 mai. 2018]. Disponível em WWW:<URL:https://www.healthcare.siemens.pt/hematology/advia-2120i-hematology-system-methods-applications>.

SILVA, A. - Seminário «O Controlo da Tuberculose: Diagnóstico e Tratamento». **DGS**. Porto. 2011).

SOCIEDADE PORTUGUESA DE GINECOLOGIA - **Revisão dos consensos em Infecções Vulvovaginais** [Em linha], atual. 2012. [Consult. 30 mai. 2018]. Disponível em WWW:<URL:http://www.spginecologia.pt/uploads/revisao_dos_consensos_em_infeccoes_vulgovaginais.pdf>.

SYSMEX - **XE-5000™- Sistema Automatizado para Hematologia** [Em linha], atual. 2010. [Consult. 26 mai. 2018]. Disponível em WWW:<URL:https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Documents/XE-5000-Português.pdf>.

THORPE, T. C. *et al.* - BacT/Alert: An automated colorimetric microbial detection system. **Journal of Clinical Microbiology**. . ISSN 00951137. 28:7 (1990) 1608–1612.

TITOU, H.; JALAL, Y.; BOUI, M. - A non-EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: about a case. **The Pan African medical journal**. . ISSN 1937-8688. 26:88 (2017).

TOISHIGAWA, K. *et al.* - Platelet Satellitism. **Internal Medicine**. . ISSN 0918-2918. 57:1949 (2018).

TRUANT, A. L. *et al.* - Comparison of formalin-ethyl ether sedimentation, formalin-ethyl acetate sedimentation, and zinc sulfate flotation techniques for detection of intestinal parasites. **Journal of Clinical Microbiology**. . ISSN 00951137. 13:5 (1981) 882–884.

UFG - **Atlas de Hematologia** [Em linha], atual. 2014. [Consult. 26 mai. 2018]. Disponível em WWW:<URL:https://hematologia.farmacia.ufg.br/p/7033-eritroblasto-basofilo>.

URRECHAGA, Eloísa - Analytical evaluation of the ADAMS™A1c HA8180T analyzer for the measurement of HbA1c. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**. . ISSN 10982825. 32:1 (2018) 1–6.

USONIS, V. *et al.* - Streptococcus pneumoniae nasopharyngeal colonisation in children aged under six years with acute respiratory tract infection in Lithuania, February 2012 to March 2013. **Eurosurveillance**. . ISSN 1560-7917. 20:13 (2015) 1–8.

VERSOLOVIC, James *et al.* - Enteroviruses and Parechoviruses. Em **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, DC : American Society of Microbiology Press, 2011. ISBN 1555814638

VIDRARIADELABORATÓRIO - **Técnica do esfregaço sanguíneo** [Em linha], atual. 2014. [Consult. 23 mai. 2018]. Disponível em WWW:<URL:http://www.vidrariadelaboratorio.com.br/tecnica-esfregaco-sanguineo/>.

WILSON, Michael *et al.* - Principles and Procedures for Blood Cultures; Approved Guideline. **Clinical and Laboratory Standars Institute**. 27:2007).

WORKOWSKI, K. A.; BERMAN, S. M. - Sexually transmitted diseases treatment guidelines. **MMWR**. . ISSN 1545-8601. 55:RR-11 (2006) 1–94.

YOUR DIAGNOSTICS PARTNER - **Premier Hb9210 ™** [Em linha], atual. 2015. [Consult. 29 mai. 2018]. Disponível em WWW:<URL:https://www.trinitybiotech.com/wp-content/uploads/2015/02/Premier-Hb9210-Brochure-2016.pdf>.

ZIMMER, A.; BURKE, V.; BLOCH, K. - Central Nervous System Infections. Em **Diagnostic Microbiology of the Immunocompromised Host**. 2. ed. Washington, DC : American Society of Microbiology, 2016. ISBN 1555813976v. 4. p. 629–651.

VIII. Anexos

8.1 Metodologia do equipamento ADVIA®2120 (Siemens) – Setor de Hematologia do Laboratório Beatriz Godinho

1 – Câmara de Reação de Hemoglobina

A determinação da hemoglobina é feita pelo método CianoMetaHemoglobina e ocorre em 2 etapas. Primeiro os eritrócitos são lisados por um detergente não iônico e libertam a hemoglobina, depois o ferro que se encontra no grupo heme da Hb é oxidado do estado ferroso (Fe^{+2}) para o férrico (Fe^{+3}), formando a MetaHemoglobina e esta é então associada ao cianeto, formando assim o produto de reação. As leituras óticas são obtidas colorimetricamente a 565 ou 546nm na câmara de reação, uma vez que esta serve também de cuvete ótica. A densidade ótica é depois convertida em concentração.

2 – Câmara de Reação de Basófilos

As reações citoquímicas dos Basófilos dividem-se em 2 etapas. Primeiro os eritrócitos e plaquetas são lisados utilizando o reagente ADVIA 2120 BASO (contém ácido ftálico), depois o citoplasma de todos os leucócitos, exceto dos basófilos é dissolvido pelo mesmo reagente e pelo aumento da temperatura na câmara de reação (entre 32°C e 34°C). Os leucócitos sem citoplasma podem agora ser categorizados como células mononucleares (linfócitos e monócitos) ou polimorfonucleares (eosinófilos e neutrófilos) com base na forma e complexidade dos seus núcleos celulares. Os basófilos intactos são maiores que os resíduos sem citoplasma das demais células por isso são facilmente distinguidos dos núcleos celulares.

3 – Câmara de Reação de Peroxidase

As reações citoquímicas de Peroxidase dividem-se em 3 etapas. Primeiro os eritrócitos são lisados utilizando o reagente ADVIA 2120 PEROX 1 (contém dodecil sulfato de sódio e formaldeído) e através da elevada temperatura na câmara (entre 58°C e 72.1°C). De seguida os leucócitos são fixados com o mesmo reagente. E por último são corados usando o reagente ADVIA 2120 PEROX 2 (contém 4-cloro-1-naftol) e ADVIA 2120 PEROX 3 (contém peróxido de hidrogénio – H_2O_2), ocorrendo a seguinte reação:

$$H_2O_2 + \text{4-cloro-1-naftol} \xrightarrow{\text{Peroxidase celular}} \text{Precipitado escuro dentro das células}$$

Os leucócitos são identificados com base no tamanho (dispersão de luz) e na coloração (Absorção de luz). Os neutrófilos, eosinófilos e monócitos são corados, apresentando um precipitado escuro em locais endógenos, devido à atividade da peroxidase, que absorve luz. Como os linfócitos, os basófilos e as grandes células não contêm peroxidase, não apresentam qualquer coloração.

4 – Câmara de Reação de Eritrócitos/Plaquetas

As reações citoquímicas nesta câmara ocorrem em 2 passos. Primeiro os eritrócitos e as plaquetas são isovolumetricamente transformados em esferas pelo reagente ADVIA 2120 RBC/PLT e depois são fixos. Este reagente contém dodecil sulfato de sódio (surfactante) e glutaraldeído (fixador) que vão tornar os eritrócitos e plaquetas esféricos, eliminando a forma como fator de variabilidade.

As células, depois, ao passarem através do laser dispersam a luz em 2 ângulos, um alto e um baixo que são usados para analisar os eritrócitos. Usando a Teoria de Espalhamento de Mie, a medida de dispersão de luz de ângulo baixo é convertida no volume da célula e a medida de dispersão de luz de ângulo alto é transformada na concentração de hemoglobina.

Para analisar as plaquetas o sinal de dispersão de luz de ângulo baixo é amplificado 30 vezes e convertido no volume da célula e o sinal de dispersão de luz de ângulo alto é amplificado 12 vezes e diz respeito ao índice de refração (n).

8.2 Metodologia do equipamento Sysmex XE-5000™ – Setor de Hematologia do Laboratório Beatriz Godinho

1 – Citometria de Fluxo Fluorescente

A citometria é uma técnica utilizada para analisar as propriedades fisiológicas e químicas das células. As amostras de sangue são aspiradas, diluídas e coradas. Dentro da câmara de fluxo as células em suspensão são orientadas num fluxo laminar e intercetadas, uma a uma, por um laser semicondutor, que consegue separar as células usando 3 sinais diretos:

- Dispersão frontal de luz (forward scatter ou FSC);
- Dispersão lateral de luz – 90° (side scatter ou SSC);
- Fluorescência lateral (side fluorescence ou SFL).

A luz dispersa frontalmente é recebida por um fotodíodo, a luz dispersa a 90° e a fluorescência são detetadas por um fotomultiplicador. Esta luz depois é convertida em pulsos elétricos, possibilitando a obtenção de informações sobre as células. A intensidade da dispersão frontal é proporcional ao tamanho células. A dispersão lateral corresponde à complexidade e granularidade das células. A fluorescência emitida indica a quantidade de DNA e RNA, ou seja, do tamanho do núcleo. (Barone e Fernandes, [s.d.])(Bruegel *et al.*, 2015)

Esta técnica é utilizada nos seguintes canais:

- <u>Canal 4DIFF</u>

A análise diferencial de leucócitos consiste numa reação citoquímica das células com o reagente, seguida de uma análise por citometria de fluxo com fluorescência. O surfactante do Stromatolyser-4DL (reagente) provoca a lise dos eritrócitos e algumas perfurações nas membranas dos leucócitos. Depois o marcador fluorescente polimetina do Stromatolyser-4DS migra para o interior dos leucócitos, fixando-se aos ácidos nucleicos e organitos celulares. O Stromatolyser-4DL (contém um ácido orgânico) liga-se aos grânulos dos eosinófilos e estes apresentam um sinal maior na dispersão lateral de luz (90°). Isto permite distinguir os eosinófilos dos neutrófilos.

Os sinais de dispersão lateral (SSC) e fluorescência lateral (SFL) são analisados e apresentados num diagrama de dispersão. Este canal fornece a contagem dos linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos. (Bain, 2016)(Bruegel *et al.*, 2015)

- <u>Canal WBC/BASO</u>

Este canal regista os sinais de dispersão frontal de luz (FSC) e dispersão lateral de luz (SSC). O reagente ácido Stromatolyser-FB lisa os eritrócitos e destrói o citoplasma dos leucócitos, exceto dos basófilos. As diferenças entre os basófilos e as restantes células são depois analisadas num gráfico de dispersão de luz, o que vai permitir a sua distinção.

O sistema produz um diagrama de dispersão de luz, onde os basófilos têm um tamanho (eixo y) superior aos restantes leucócitos, pois são os únicos que estão intactos, com

citoplasma. Este canal fornece a contagem dos basófilos e do número total de leucócitos. (Bain,2016)(Bruegel *et al.*, 2015)

- Canal RET/PLT-O

Neste canal, o surfactante do RET-SEARCH (II) perfura ligeiramente as membranas celulares dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas, permitindo a entrada do marcador fluorescente nas células. Este marcador evidencia os ácidos nucleicos dos leucócitos, eritrócitos nuceados, reticulócitos e plaquetas. Usa os sinais de dispersão frontal de luz (FSC) e fluorescência lateral (SFL) para a distinção dos reticulócitos das restantes células.

- Canal NRBC

Neste canal são medidos os eritroblastos (Nucleated Red Blood Cells-NRBC). A membrana dos eritrócitos é lisada, fincando intacto o núcleo dos eritroblastos. A membrana dos leucócitos não sofre lise, pelo que quando medidos vão apresentar maior tamanho (núcleo+citoplasma) que os eritroblastos (só núcleo). Depois interagem com um corante fluorescente, que vai corar os ácidos nucleicos dos eritroblastos e dos leucócitos. Usa os sinais de dispersão frontal de luz (FSC) e fluorescência lateral (SFL) para a distinção das células. (Bain, 2016)(Bruegel *et al.*, 2015)

2 – Método de RF-DC

O Método de deteção por Radiofrequência/ Corrente Contínua deteta as células a partir de pulsos elétricos que estas geram quando imersas numa solução eletrolítica (meio condutor). As amostras sanguíneas são diluídas e aspiradas para a câmara de deteção onde se encontra a solução eletrolítica e onde flui Corrente Contínua e Radiofrequência. As células ao passarem junto dos elétrodos provocam alterações na Corrente Contínua que é proporcional ao tamanho da célula e alterações na Radiofrequência que é proporcional à densidade do interior das células. Estas alterações na corrente geram pulsos elétricos de diferentes intensidades. Quanto maior a intensidade de um pulso maior o tamanho ou densidade da célula e quanto mais pulsos houver, maior é o número de células em suspensão. (Barone e Fernandes, [s.d.])(Bruegel *et al.*, 2015)

- Canal IMI

Neste canal de Informação de Imaturidade das Células Mieloides, as células maduras ao contactarem com o reagente Stromatolyser-IM vão ficar com as suas membranas danificadas, uma vez que possuem alta concentração de lípidos, e os componentes celulares são eluídos.

A membrana das células imaturas contêm uma quantidade pequena de lípidos e uma quantidade elevada de amicoácidos. As membranas destas células também ficam danificadas mas, antes da eluição dos componentes celulares, o reagente penetra na célula e fixa a membrana e os componentes celulares. Através do Método RF/DC, o equipamento consegue distinguir os blastos, granulócitos imaturos (promielócitos, mielócitos e metamielócitos) e bastonetes. (Bruegel *et al.*, 2015)

3 – Corrente Contínua e Foco Hidrodinâmico

Este método de deteção envolvendo Corrente Contínua é utilizado para contar eritrócitos e plaquetas. Uma parte da amostra de sangue é aspirada, diluída e enviada para a câmara de deteção, passando através de um orifício, chamado abertura. Aqui também existem 2 elétrodos, um de cada lado da abertura, através dos quais passa Corrente Contínua. A resistência à corrente entre os elétrodos varia à medida que as células em suspensão passam. Esta resistência provoca uma alteração do pulso elétrico proporcional ao tamanho da célula.

O Foco Hidrodinâmico permite que as células passem pela abertura, centro do transdutor, em linha reta, prevenindo deste modo a geração de pulsos anormais que poderiam ocorrer se as células passassem noutro ponto que não o centro. Assim que as células passam na abertura, são captadas por um fluxo inverso e enviadas para o escoamento, impedindo que voltem para trás e que gerem impulsos falsos de plaquetas. Este método melhora a precisão e reprodutibilidade da contagem das células. (Bruegel *et al.*, 2015)

- Canal RBC/PLT

O sangue é aspirado, diluído e enviado para a câmara de reação. Depois o pistão injetor envia lentamente a amostra para o detetor de eritrócitos e plaquetas. Este detetor conta e determina o tamanho dos eritrócitos e das plaquetas transformando os pulsos elétricos num histograma da distribuição de volumes.

8.3 Colorações usadas no Laboratório de Microbiologia do SPC do CHL

Coloração de Gram

Esta técnica diferencia bactérias Gram positivo de bactérias Gram negativo, com base na diferente constituição da parede celular.

1. Cristal Violeta – Penetra a parede bacteriana, corando todas as bactérias;
2. Lugol – Forma um complexo com o cristal violeta e permite manter a durabilidade da cor;
3. Álcool-acetona – Remove os complexos formados anteriormente das bactérias Gram negativo, devido à fina camada de peptidoglicano. Os complexos formados nas bactérias Gram positivo ficam retidos no interior da espessa camada de peptidoglicano conferindo-lhes a coloração roxa. Este diferenciador permite ainda a permeabilização da membrana externa das bactérias Gram negativo, o que facilita a sua descoloração;
4. Água – Lavagem da preparação, eliminação de reagentes em excesso;
5. Fucsina – Dá uma coloração cor-de-rosa às bactérias Gram negativo.

Bactérias Gram negativo: cor-de-rosa e Bactérias Gram positivo: roxo.

Coloração de Ziehl-Neelsen

Esta técnica permite a pesquisa de micobactérias. Estas possuem um alto teor lipídico (ácidos micólicos) na sua parede celular que as impermeabiliza aos corantes aquosos utilizados na coloração de Gram e lhes dá resistência ao álcool-ácido usado nesta coloração e por isto são chamadas de bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR).

1. Fucsina – Penetra a parede bacteriana, corando todas as bactérias;
2. Álcool-ácido – Penetra em todas as bactérias descorando-as, exceto as micobactéria;
3. Água – Lavagem da preparação, eliminação de reagentes em excesso;
4. Azul de metileno – Cora as bactérias que foram descoradas anteriormente.

Micobactérias: cor-de-rosa e outras bactérias: Azul

8.4 Meios de Cultura usados no Laboratório de Microbiologia do SPC do CHL

Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS)

Meio de isolamento, nutritivo que se destina a facilitar o crescimento de microrganismos exigentes. A presença de sangue de carneiro permite a expressão da hemólise, que é um critério de base para a orientação da identificação bacteriana.

Hemólise α: coloração esverdeada à volta da colónia;

Hemólise β: zona clara à volta da colónia ou por baixo da colónia.

Haemophilus Selective Agar

Gelose de chocolate com Vitox, Bacitracina, Vancomicina e Anfotericina B. Meio enriquecido para cultivo de bactérias exigentes, contém glóbulos vermelhos lisados que libertam hemina (fator X) e NAD (fator V) necessários ao crescimento de *Haemophilus influenzae*. Além de nutrientes, contém antibióticos que inibem principalmente bactérias Gram positivo e Anfotericina B eficaz contra leveduras e fungos.

Uriline 3 Enterococcus

Tubo fechado composto por uma lâmina de duas faces coberta pelos seguintes meios de cultura: Gelose CLED, Gelose MacConkey e Gelose para deteção de enterococos. Destina-se à sementeira de urinas.

CLED: Contagem de microrganismos urinários. Diferencia bactérias fermentadoras (colónias amarelas) de não fermentadoras da lactose (colónias verdes/azuis/incolores).

MacConkey: Crescimento seletivo, devido à presença de sais biliares que impedem o crescimento de bactérias Gram positivo, e diferenciação das enterobactérias. Bactérias que fermentam a lactose originam colónias vermelhas e bactérias que não fermentam a lactose geram colónias incolores/beges.

Enterococcus: Meio seletivo devido à presença de um suplemento de cloreto de trifenil tetrazolium (TTC), cristal violeta e dois antibióticos (polimixina e ácido nalidíxico). Os enterococos originam colónias castanhas-avermelhadas com presença eventual de um reflexo metálico.

Gelose Granada (GRAN)

Meio seletivo utilizado para a deteção e identificação direta de *Streptococcus agalactiae* nas mulheres grávidas e nos recém-nascidos. A presença de metotrexato, soro de cavalo e amido permite a produção de um pigmento cor de laranja específico das colónias de estreptococos do grupo B hemolíticos. As colónias de microrganismos pertencentes a outras espécies são inibidas ou desenvolvem-se dando outra cor. A mistura de antibióticos inibe a maioria das bactérias Gram negativo e leveduras. A incubação é efetuada em anaerobiose.

Gelose Hektoen (HEKT)

Meio seletivo de isolamento e diferenciação para a deteção de espécies de *Salmonella* e *Shigella*. Os microrganismos que fermentam os açúcares do meio (lactose, sacarose e salicina) formam colónias amarelas/cor-de-rosa amarelado, os que não fermentam originam colónias de cor verde/verde azulado. Os microrganismos produtores de sulfureto de hidrogénio (H_2S) formam colónias com um centro preto. A inibição de bactérias Gram positivo é obtida através da presença de sais biliares.

Salmonella: colónias de cor verde/verde azulado com ou sem um centro preto;

Shigella: colónias de cor verde/verde azulado sem um centro preto.

Gelose SS (SS)

Meio seletivo de isolamento e diferenciação para a deteção de espécies de *Salmonella* e *Shigella*. Os microrganismos fermentadores da lactose produzem colónias cor-de-rosa, os que não fermentam dão origem a colónias incolores. As bactérias redutoras de tiossulfato, produzem sulfureto de hidrogénio (H_2S) e formam colónias com um centro preto. A inibição de bactérias Gram positivo são obtidas através da presença de sais biliares.

Salmonella: colónias incolores/amarelo pálido com ou sem um centro preto;

Shigella: colónias incolores/rosa pálido sem um centro preto.

Gelose chromID Candida (CAN2)

Isolamento seletivo de leveduras, identificação da espécie *Candida albicans* e diferenciação presuntiva de *Candida tropicalis*, *Candida lusitaniae* e *Candida kefyr*. A identificação de *C. albicans* baseia-se na deteção da atividade enzimática da hexosaminidase, específica desta espécie, utilizando um substrato cromogéneo contido no meio, que induz colónias azuis. A eventual hidrólise de um segundo substrato origina colónias cor-de-rosa característica de *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* e *C. kefyr* . Colónias branco creme não têm valor preditivo. A mistura de antibióticos permite inibir o crescimento da maior parte das bactérias.

Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol 2

Meio seletivo para a cultura de leveduras e fungos filamentosos. A presença de peptonas e de glucose favorece o desenvolvimento de estirpes fúngicas. A presença de gentamicina permite inibir a maioria das bactérias Gram negativo e Gram positivo. O clorafenicol melhora a seletividade em relação a determinadas espécies por vezes resistentes à gentamicina (estreptococos, *Proteus*…). O ph da gelose, ligeiramente ácido, favorece o crescimento dos fungos em relação ao desenvolvimento bacteriano.

Incubar a 37°C durante 1 a 7 dias (urina, fezes, LBA) ou a 25°C durante 3 a 21 dias (pele). A identificação dos microrganismos isolados deve ser efetuada por exame direto (macro e microscópico).

Gelose CLED

Meio de isolamento para microrganismos do trato urinário, no entanto também é usado para repicagem quando se observa presença de *Proteus* spp. noutras amostras biológicas, pois este meio evita a sua mobilidade, devido à deficiência de eletrólitos. Permite a diferenciação de bactérias fermentadoras e não fermentadoras da lactose.

Fermentadores da lactose: colónias amarelas pálidas;

Não fermentadores da lactose: colónias verdes/azuis/incolores.

Gelose Mueller Hinton E (MHE)

Meio que se destina à realização de antibiogramas por difusão e à determinação de Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI). Permite o crescimento de bactérias não exigentes e no laboratório é usado maioritariamente para identificação de *Haemophilus influenzae*, utilizando discos com os fatores V e X. Esta bactéria como é exigente apenas vai crescer à volta destes discos.

Caldo Coração-cérebro (BHI-T)

Caldo composto por uma base nutritiva enriquecida para o crescimento de microrganismos aeróbios exigentes. Após incubação, o crescimento bacteriano é observado pela turvação do caldo. Deve então repicar-se para um meio apropriado, em placa de Petri.

Caldo Selenito F

Este meio destina-se ao enriquecimento da *Salmonella* a partir das fezes. A sua composição favorece o crescimento desta bactéria no seio de uma flora polimicrobiana. Após a etapa de enriquecimento, o caldo Selenito deve ser repicado em meios destinados à deteção da *Salmonella*.

8.5 Testes bioquímicos rápidos para identificação presuntiva de bactérias

Teste da citocromo-oxidase

As citocromo-oxidases são enzimas que transferem eletrões (hidrogénio) na cadeia de respiração aeróbia para o oxigénio, com formação de água. O teste utiliza um corante que substitui o oxigénio como aceitador final de eletrões. Esta técnica é feita em tiras de papel que já contém o reagente (tetrametil-p-fenilenodiamina dihidrocloreto), quando em contacto com uma colónia com bactérias que contenham a atividade enzimática aparece uma cor roxa em 10 seg, uma vez que a enzima vai oxidar este aceitador final.

Teste da coagulase

A coagulase é uma enzima termoestável produzida principalmente pelas estirpes de *S.aureus*. O reagente usado é plasma de coelho tratado com um anticoagulante. O teste consiste em adicionar uma colónia de bactérias ao reagente, se forem coagulase positiva, esta atua diretamente no fibrinogénio plasmático e causa alglutinação das bactérias em agregados visíveis.

Teste da catalase

A enzima catalase degrada o peróxido de hidrogénio ($2H_2O_2$) em água (H_2O) e oxigénio (O_2). É usado como reagente peróxido de hidrogénio, ao qual é adicionada uma colónia de bactérias, se houver formação de bolhar de ar (O_2) é uma reação positiva, o que significa que a bactéria produz a enzima catalase.

Prova da optoquina

A optoquina, um derivado da quinina, inibe seletivamente o crescimento de *Streptococcus pneumoniae* em concentrações muito baixas (≤5μg/mL). Esta prova de sensibilidade utiliza um disco de optoquina que se difunde rapidamente em meio de cultura sólido, que deve ser previamente inoculado com a suspensão bacteriana. Depois deve ser incubado a 37°C durante 18-24 horas. É indicada para diferenciar estreptococos α-hemolíticos e pneumococos (*S. pneumoniae*), este último irá apresentar um halo de inibição ≥14mm.

Prova da bacitracina

A bacitracina permite a identificação presuntiva de estreptococos β-hemolíticos. É utilizado um disco de bacitracina que é aplicado em gelose de sangue que contém um inoculo de uma suspensão bacteriana a ser testada. É feita uma incubação a 37°C durante 18-24 horas. A presença de qualquer halo de inibição à volta do disco é interpretado como sensibilidade à bacitracina e indicativo de *Streptococcus pyogenes*. Quando há crescimento, isto é resistência à bacitracina, diz-se ser *Streptococcus agalactiae*.