



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Catarina Garcia Abrantes

Relatório de Estágio
Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Maria Celeste Fernandes Lopes e pelo Dr. António Fernandes e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2019



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Catarina Garcia Abrantes

RELATÓRIO DE ESTÁGIO MESTRADO DE ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientada pela
Professora Doutora Maria Celeste Fernandes Lopes e pelo Dr. António Fernandes
apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2019

Agradecimentos

Expresso o meu agradecimento sincero à Professora Doutora Maria Celeste Lopes por todo o apoio, motivação, tempo, orientação e críticas construtivas ao longo da realização do relatório.

Ao Dr. António Fernandes e a toda a equipa técnica do Laboratório Germano de Sousa do Hospital CUF Viseu, que me receberam tão bem e permitiram que este processo fosse entusiasmante. Agradeço todos os conhecimentos transmitidos, conselhos, disponibilidade, acompanhamento e ajuda, que permitiram que evoluísse e adquirisse experiência laboratorial.

Aos meus pais, irmã e restante família, que desde a entrada no ensino superior me deram os melhores conselhos e nunca me deixaram desistir, mesmo quando encontrava pedras no caminho, dando-me força e apoio para continuar.

Aos amigos de sempre e aos que Coimbra me deu pelo pilar que foram, pelos momentos vividos e o apoio incessante permitindo que tudo fosse muito mais fácil.

E a todas as pessoas que de uma maneira ou de outra contribuíram para que isto fosse possível e se concretizasse.

Índice

Agradecimentos	3
Índice	5
Índice de Tabelas.....	7
Índice de Figuras.....	7
Abreviaturas.....	9
Resumo	11
Abstract	11
Introdução.....	13
Caracterização do Laboratório de Estágio	14
Setor de Bioquímica	16
Setor da Imunologia	18
Setor da Hematologia.....	21
Hemograma	21
Sysmex XT-1800i e Sysmex XT-4000i.....	22
Fonte: (Hoffbrand e Moss, 2016)	23
Eritrócitos	23
Índices eritrocitários.....	24
Reticulócitos	28
Leucócitos.....	29
Plaquetas	32
Esfregaço sanguíneo periférico	33
Hemóstase.....	34
Sysmex CA-500	35
Tempo de Protrombina (TP).....	35
Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (aPTT)	36
Tempo de Trombina (TT).....	36
Fibrinogénio.....	36
D-Dímeros.....	36
Velocidade de Sedimentação Eritrocitária	37
Ves-Matic CUBE 30	37
Eletroforese de Hemoglobinas	38
Hemoglobina Glicada	38
HA-8160 HbA1c	39
Caso Clínico.....	39

Setor da Microbiologia Clínica.....	41
A célula bacteriana.....	42
Identificação bacteriana	43
Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos	48
Amostras biológicas	49
Urina.....	49
Fezes.....	52
Sangue - Hemocultura.....	54
Exsudato vaginal e uretral.....	56
Amostras do trato respiratório superior.....	57
Amostras do trato respiratório inferior	58
Feridas (abcesso, pus)	60
Caso Clínico	62
Conclusão.....	64
Bibliografia	66

Índice de Tabelas

Tabela I - Todos os equipamentos que constituem o Laboratório, por setor.....	16
Tabela II - Parâmetros bioquímicos determinados pelo Dimension® RXL Max RMS e Dimension® RXL Max.....	17
Tabela III - Parâmetros imunológicos determinados pelo ADVIA® Centaur XP.....	19
Tabela IV - Parâmetros determinados pelo mini VIDAS® Blue.....	19
Tabela V - Teste serológicos realizados no Laboratório.....	20
Tabela VI - Parâmetros determinados no Hemograma.....	23
Tabela VII - Classificações das anemias.....	25
Tabela VIII - Meios de cultura do Laboratório de Estágio.....	46
Tabela IX - Métodos bioquímicos que auxiliam na identificação bacteriana.....	47
Tabela X - Principais infecções do trato genital.....	57
Tabela XI - Infecções do trato respiratório superior e inferior.....	60
Tabela XII - Infecções da pele e tecidos moles.....	61

Índice de Figuras

Figura 1 - Proteinograma eletroforético normal.....	18
Figura 2 - Molécula da Hemoglobina.....	23
Figura 3 - Alterações na forma do eritrócito.....	27
Figura 4 - Esquema da Hematopoiese.....	30
Figura 5 - Glóbulos brancos (leucócitos).....	31
Figura 6 - Técnica de esfregaço sanguíneo.....	33
Figura 7 - Cascata de Coagulação.....	34
Figura 8 - Boletim de análises clínicas.....	39
Figura 9 - Imagem microscópica do esfregaço sanguíneo periférico.....	40
Figura 10 - Tipos morfológico e formas de associação das bactérias e exemplos de cada.....	42
Figura 11 - Parede celular de bactérias Gram-positivo.....	43
Figura 12 - Parede celular de bactérias Gram-negativo.....	44
Figura 13 - Parede celular de micobactérias.....	44
Figura 14 - Interpretação de resultados.....	54
Figura 15 - Frascos de hemocultura.....	55
Figura 16 - Crescimento bacteriano no meio de cultura Campyloset.....	63
Figura 17 - Microrganismo do género <i>Campylobacter spp.</i>	63

Abreviaturas

ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
aPTT	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado
AST	Aspartato aminotransferase
CAM	Gelose Campyloset
CAN2	Gelose chromID™ Candida
COS	Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro
CPSE E CPSO	Gelose chromID® CPS® Elite
CQI	Controlo de Qualidade Interno
EBV	Vírus Epstein-Barr
ESP	Esfregaço Sanguíneo Periférico
GT	Gama-glutamil transferase
HAE2	Gelose de Haemophilus 2
HbA1c	Hemoglobina glicada
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HEKT	Gelose Hektoen
ID	Identificação bacteriana
INR	International Normalised Ratio
LJ-T	Meio Lowenstein-Jensen
MCK	Gelose MacConkey
MCV	Volume Corpuscular Médio
MSA2	Gelose de Chapman 2
PVX	Gelose Chocolate PolyVitex
RPM	Rotações por minuto
SELENITO F-T	Caldo Selenito F
TP	Tempo de Protrombina
TSA	Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos
TT	Tempo de Trombina
VCA3	Gelose Chocolate PolyViteX™ VCAT3
VSE	Velocidade de Sedimentação Eritrocitária

Resumo

O Mestrado de Análises Clínicas, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, inclui como unidade curricular um estágio final, que tem como objetivo levar o mestrando a um contexto real de trabalho, aprofundar e sedimentar conhecimentos teóricos já adquiridos ao longo do curso, bem como adquirir novas competências a nível prático nas diversas áreas.

Este estágio decorreu entre dezembro de 2018 e maio de 2019, no Laboratório Germano de Sousa do Hospital CUF Viseu.

O presente relatório caracteriza o laboratório de estágio, os setores de Bioquímica, Imunologia, Hematologia e Microbiologia. Dada a diversidade, extensão e complexidade irei apenas dar destaque às últimas duas, uma vez que foram as valências por mim escolhidas. Contudo irei abordar, de forma breve, as duas primeiras áreas – Bioquímica e Imunologia – já que na área de Análises Clínicas são igualmente importantes.

Palavras-chave: análises clínicas; área laboratorial; diagnóstico; hematologia; microbiologia; saúde

Abstract

The Master of Clinical Analysis, of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra, includes as a curricular unit a final internship, which objective is to lead the Master to a real work context, to know and to sediment theoretical knowledge already acquired throughout the course, how to acquire new skills at a practical level in the various areas.

This internship took place between December 2018 and May 2019, at the Germano de Sousa Laboratory of CUF Viseu Hospital.

This report characterizes the laboratory, the sectors of Biochemistry, Immunology, Hematology and Microbiology. Given the diversity, extension and complexity I will only highlight the last two, since they were the valences I chose. However, I will briefly mention the first two areas - Biochemistry and Immunology - since in the area of Clinical Analyzes they are equally important.

Keywords: clinical analysis; laboratory area; diagnosis; hematology; microbiology; health

Introdução

As análises clínicas são um dos mais importantes meios complementares de diagnóstico, uma vez que contribuem para o diagnóstico, prognóstico, tratamento, monitorização e prevenção de patologias ou doenças de maior ou menor gravidade.

Dependendo do tipo de análise que se pretende recolhe-se o produto biológico necessário, que podem ser: urina, fezes, expetoração, aspirados, tecidos, líquido sinovial, pleural, cefalorraquidiano, cateteres, entre outros, a fim de obter informações necessárias para fazer o diagnóstico.

É uma área que nos últimos anos tem sofrido uma grande evolução tecnológica, o que permite ter equipamentos automatizados, com métodos cada vez mais sensíveis e precisos, permitindo análises realizadas em menos tempo e menos sujeitas ao erro humano. Por isso, é fundamental a exigência e o rigor não só por parte do técnico laboratorial que deve cumprir boas práticas laboratoriais, mas também pela implementação de controlos de qualidade interna e participar em avaliações externas de qualidade. Tanto os equipamentos, como os reagentes devem ser sujeitos a manutenções diárias, calibrações e controlos de qualidade com o objetivo de assegurar a obtenção de resultados confiáveis. A implementação de sistemas informáticos, como forma de automatização dos processos pré-analítico, analítico e pós-analítico, também contribuem para a minimização do erro humano. Portanto, bons resultados implicam procedimentos de qualidade desde a colheita até à obtenção dos mesmos e deste modo assegurar a credibilidade das análises clínicas.

O primeiro ano do Mestrado de Análises Clínicas oferece um leque de unidades curriculares teóricas, onde adquirimos conhecimentos necessários para o estágio curricular final que, no meu caso, decorreu desde dezembro de 2018 a maio de 2019, no Laboratório Germano de Sousa do Hospital CUF Viseu, orientado pelo Dr. António Fernandes.

O estágio curricular teve como objetivos solidificar os conhecimentos já adquiridos, estar em contexto real de trabalho, onde foi possível integrar uma rotina laboratorial participando nas diversas tarefas diárias, desde a receção de amostras até ao acompanhamento da validação de resultados. Apesar de ter passado pelas quatro grandes áreas de Análises Clínicas – Bioquímica, Imunologia, Hematologia e Microbiologia - no presente relatório abordarei resumidamente as áreas de Bioquímica e Imunologia e de forma mais completa as áreas de Hematologia e Microbiologia.

Caracterização do Laboratório de Estágio

O estágio foi realizado no Laboratório Germano de Sousa, que é integrado no Hospital CUF Viseu. Tem como diretor técnico o Dr. António Fernandes, Farmacêutico e especialista em Análises Clínicas e Genética Humana, sete Técnicas Superiores de Diagnóstico e Terapêutica e uma Técnica Superior de Saúde.

O laboratório dá resposta a nível hospital, ao serviço de urgência e ao posto de colheitas ambulatorio do Hospital, bem assim como a nível comunitário, os diversos postos de colheita externos, distribuídos por diferentes locais, dentro e fora de Viseu.

O laboratório é composto por uma sala ampla onde se encontram os setores de Bioquímica e Imunologia, uma sala do setor de Serologia, uma sala do setor de Hematologia, uma sala do setor de Microbiologia, uma sala de lavagens, um gabinete de validação, uma receção, uma sala polivalente e uma sala de triagem.

As amostras vindas do Serviço de Urgência do Hospital, já vêm devidamente etiquetadas com código de barras, devem ser triadas e processadas o mais rápido possível, uma vez que o clínico está à espera desses resultados para dar seguimento à terapêutica do doente. Já os produtos que vêm de postos externos ao Laboratório são transportados de maneira a não os inviabilizar em malas com temperaturas controladas. Desde que as amostras chegam ao laboratório são direcionadas para a sala de triagem, onde são triadas – verificando a qualidade das amostras e se estão etiquetadas/identificadas – centrifugadas, se necessário e, por fim, separadas pelos diversos setores de Bioquímica, Imunologia, Hematologia e Microbiologia, consoantes as requisições clínicas. Há alguns parâmetros que não são realizados neste laboratório e separam-se alíquotas, que são armazenadas e enviadas para laboratórios externos com os quais têm protocolos, nomeadamente para o Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa (Laboratório Central) em Lisboa e para o Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa no Porto, onde se encontra a unidade de citometria.

Posto isto, os produtos biológicos são processados e levam à emissão de resultados, que são sujeitos a validação analítica e biopatológica.

É de salientar que este laboratório tem uma grande preocupação com a qualidade dos resultados obtidos. Exatidão e precisão são uma necessidade constante e, como tal primam por fazer sempre vários níveis de amostras de Controlo de Qualidade Interno (CQI) nos diversos equipamentos e parâmetros executados, utilizando preparações comerciais que podem integrar os kits de reagentes ou adquiridos isoladamente. As cartas de Controlo de Qualidade Interno são diariamente monitorizadas pelas técnicas responsáveis de cada setor,

seguindo regras estritas. As avaliações das mesmas são sujeitas ao parecer do Responsável da Qualidade, o Dr. António Fernandes, veiculado na forma de avaliação mensal.

O cuidado com a exatidão está bem patente nos Programas de Avaliação Externa de Qualidade (AEQ) em que participa, como o SEQC^{ML} (*Sociedad Española de Medicina de Laboratorio*), UK NEQAS (*United Kindom National External Quality Assessment Services*) e o Plano Nacional de Avaliação Externa da Qualidade Laboratorial do Instituto Ricardo Jorge (*Germano de Sousa - Centro de Medicina Laboratorial*). É efetuada através do ensaio de amostras cegas que são processadas como uma amostra corrente. Trata-se de preparações comerciais adquiridas pela empresa fornecedora, que também se compromete a fazer avaliação dos resultados obtidos, comparando-os com resultados obtidos de outros laboratórios inscritos no Programa. Posteriormente é enviado um relatório quantificando o desempenho do Laboratório e identifica desempenhos desadequados, que necessitam de ação corretiva para que não comprometam a qualidade de análises futuras.

Tudo isto é complementado com manutenções que os equipamentos automatizados exigem, são sujeitos a controlos diários e a calibrações periódicas ou sempre que há um novo lote de reagente.

O laboratório encontra-se certificado de acordo com a Norma ISO 9001:2015, que através de um conjunto de normas visa orientar a implementação e manutenção de um sistema de gestão de qualidade (SGQ), proporcionando benefícios para o Laboratório, melhorando o seu desempenho e capacidades globais, indo ao encontro dos requisitos, das necessidades e expectativas dos seus utentes de uma forma eficaz e eficiente, numa perspetiva de melhoria contínua.

Na tabela seguinte encontram-se os aparelhos que constituem o laboratório, divididos por setores.

Tabela I - Todos os equipamentos que constituem o Laboratório, por setor

Setor	Equipamentos	
Bioquímica	Dimension® RXL Max RMS Siemens	
	Dimension® RXL Max Siemens	
	MiniCap Sebia	Eletroforese proteínas séricas
Imunologia	ADVIA® Centaur XP	
	Mini VIDAS® Blue	
Hematologia	Sysmex XT-1800i	Hemograma, contagem de reticulócitos, contagem diferencial de leucócitos
	Sysmex XT-4000i	
	Ves-Matic CUBE 30	Velocidade de sedimentação eritrocitária
	HA-8160 HbA1c	Determinação hemoglobina glicada
	Sysmex CA-500	Estudo da hemóstase
Microbiologia	BD Bactec™ 9050	Hemoculturas
	VITEK® 2	Identificação microbiana e testes de sensibilidade aos antibióticos
	Câmara de Fluxo Laminar	
Analisadores de Urina	Aution Max AX-4280	
	Aution Jet AJ-4270	
Outros	Centrifugas	
	Estufas calibradas	
	Frigoríficos calibrados	

No laboratório os setores de Bioquímica, Imunologia e Hematologia funcionam como um todo, enquanto que o setor de Microbiologia está noutro setor, onde inclui várias vertentes, tais como Bacteriologia, Parasitologia e Micologia.

Setor de Bioquímica

É no setor de Bioquímica que se encontra o maior volume de amostras a processar, uma vez que os parâmetros bioquímicos permitem avaliar a dinâmica dos sistemas hepático, renal, pancreático, cardiovascular, entre outros. A amostra maioritária é o soro, mas também urina. Para se obter soro, a colheita de sangue é feita para um tubo sem anticoagulante, com esferas ativadoras da coagulação e gel separador.

Depois da colheita, as amostras são sujeitas a uma centrifugação de 3000 rotações por minuto (rpm), durante 10 minutos. Já as amostras de urina ocasional ou de 24 horas são centrifugadas a 3000 rpm, durante 5 minutos, uma vez que a matriz proteica é menos densa. A partir daí podem ser processadas.

O setor de Bioquímica é uma área muito automatizada, constituída por dois equipamentos automáticos: Dimension® RXL Max com unidade RMS e Dimension® RXL Max, ambos da Siemens. O primeiro equipamento está mais direcionado para a rotina e incorpora uma unidade ISE onde são determinadas espécies iônicas, enquanto que o segundo, também com unidade ISE, é para as urgências que poderão aparecer vindas do Serviço de Urgência, pelo que deve estar mais liberto. Dado que é uma área muito automatizada é crucial que os equipamentos estejam devidamente calibrados e controlados para que haja confiabilidade nos resultados. Para a medição dos parâmetros bioquímicos os ensaios baseiam-se em métodos espectrofotométricos, turbidimétricos e potenciométricos (ISE). Na Tabela II encontram-se os parâmetros bioquímicos que são determinados no laboratório de estágio, dividindo-se por funções/metabolismo.

Tabela II - Parâmetros bioquímicos determinados pelo Dimension® RXL Max RMS e Dimension® RXL Max

Função/Metabolismo	Parâmetros Bioquímicos
Doenças Auto-imunes	Fator reumatóide
Doenças Infeciosas	Anticorpos antiestreptolisina O (ASO)
Eletrólitos	Ionograma (Potássio, Sódio e Cloreto)
Função Cardíaca	Creatinina cinase (CK) e Lactato desidrogenase (LDH)
Função Hepática	Aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT), Gama-glutamil transferase (GT), Fosfatase Alcalina (ALP/AP), Bilirrubina total e Bilirrubina direta
Função Pancreática	Amilase
Função Renal	Ureia, Creatinina Ácido úrico, Microalbumina
Metabolismo do Ferro	Ferro, Capacidade Total de Ligação do Ferro, Transferrina
Metabolismo Glucídico	Glicose
Metabolismo Lipídico	Colesterol Total, Colesterol HDL, Triglicerídeos
Metabolismo Mineral e Ósseo	Cálcio, Fosfato, Lítio, Magnésio
Metabolismo Proteico	Proteína C Reativa (PCR), Albumina, Proteínas Totais e Proteínas Urinárias
Monitorização de Fármacos	Lítio, Valproato, Carbamazepina, Gentamicina

Além das determinações automáticas no Dimension® RXL Max e Dimension® RXL Max RMS, no MiniCap Sebia é possível a separação eletroforética das proteínas totais do soro nas diversas componentes proteicas que a constituem.

Este método deteta e quantifica componentes monoclonais para o diagnóstico e monitorização dos pacientes com gamopatias monoclonais (Mieloma Múltiplo, Doença de Waldenström, entre outras). Num proteinograma normal, as proteínas séricas são separadas, através da mobilidade eletroforética, em seis frações principais: Albumina, alfa-1, alfa-2, beta-1, beta-2 e gama.

Na Figura 1 está representado um Proteinograma eletroforético normal, onde se pode observar as principais frações (como o MiniCap tem maior resolução separa ainda a fração beta em beta-1 e beta-2), em que a mais intensa, isto é, a de menor peso molecular e maior carga elétrica negativa é a albumina (proteína mais abundante no soro humano).

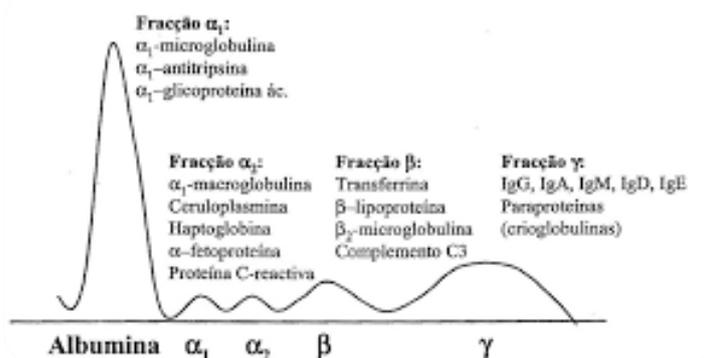


Figura 1- Proteinograma eletroforético normal

Fonte da figura: https://kipdf.com/electroforese-de-proteinas-plasmaticas_5aacae07origem1723dd03cf278070.html

Setor da Imunologia

No setor de Imunologia determinam-se alguns parâmetros, que podem dividir-se em vários grupos: marcadores tumorais, marcadores endocrinológicos ou hormonais, marcadores tiroideios, marcadores cardíacos, marcadores de doenças infecciosas (imunoserológicos), marcadores de anemia e marcadores de sépsis.

Mais uma vez, o produto biológico usado é o soro. Se a amostra já passou pelo setor de Bioquímica é sujeita a uma nova centrifugação a 3000 rpm, durante 10 minutos, com o objetivo de a amostra ficar mais límpida. Caso a requisição só tenha parâmetros imunológicos, depois da amostra ser triada é centrifugada a 3000 rpm, durante 10 minutos e levada para o setor de Imunologia.

Assim como o setor de Bioquímica, o setor de Imunologia é igualmente muito automatizado, pelo que também é muito importante manter as calibrações, controlos e manutenções em dia. As amostras são processadas no ADVIA® Centaur XP, equipamento automático de imunoensaio, com recurso a técnica de quimioluminescência, ou seja, mede a quantidade de luz emitida durante a reação quimioluminescente desencadeada pela alteração de pH devido à adição de um ácido e uma base no final da reação. Com esta metodologia, a luz emitida é proporcional à quantidade do analito presente na amostra. O marcador de

quimioluminescência usado é o Éster de Acridina. Este equipamento deteta antígenos e anticorpos através do imunoensaio do tipo Sandwich e do imunoensaio competitivo.

Na tabela seguinte, encontram-se os parâmetros analíticos efetuados no ADVIA® Centaur XP, por tipo de ensaio.

Tabela III - Parâmetro imunológicos determinados pelo ADVIA® Centaur XP, por tipo de ensaio

Analito	Tipo de ensaio
AgHbs, Anti-Hbs, Anti-HCV, Ca125, CEA, Ferritina, FSH, HIV, PSA, PSA livre e TSH	Sandwich
T3, FT3, FT4 e Vit B12	Competitivo

Na sala ampla, “open-space”, onde estão os setores de Bioquímica e Imunologia há ainda um equipamento que mede, essencialmente, parâmetros de urgência, o mini VIDAS® Blue. É um sistema automatizado de imunoensaio com base nos princípios ELFA (Teste Imunoenzimático por Fluorescência). Processa testes de vários tipos de análise: serologia, imunoquímica e detecção de antígenos. Todas as etapas – pipetagem, incubação, lavagem, leitura resultados impressos numa impressora integrada – da reação enzimática no imunoensaio são executadas de forma simples, rápida, precisa e num espaço mínimo.

Apesar de serem medidos, na sua maioria, parâmetros de amostras vindas do Serviço de Urgência, também mede parâmetros de rotina, como a gonadotrofina coriônica humana (BhCG).

Na Tabela IV estão representados os parâmetros realizados no mini VIDAS® Blue, em que se distingue os parâmetros considerados, pelo laboratório de estágio, de urgência (Troponina I, Mioglobina, NT-proBNP, CK-MB, D-Dímeros, Procalcitonina) e o parâmetro que pode ser pedido como urgente, ou não consoante o pedido do clínico ou do indivíduo, como a gonadotrofina coriônica humana.

Tabela IV - Parâmetros determinados pelo mini VIDAS® Blue

Parâmetros de Urgência	Cardíacos	Troponina I, Mioglobina, NT-proBNP, CK-MB
	Tromboembolismo Venoso	D-dímeros
	Infeção Bacteriana	Procalcitonina (PCT)
Outros Parâmetros	Gonadotrofina coriônica humana (BhCG)	

Há ainda uma sala que constitui o setor de Serologia onde se fazem variados testes serológicos. São exames realizados com o soro humano, que serve para detetar a presença

de anticorpos gerados pelo organismo contra antígenos pertencentes aos agentes infecciosos, de maneira a detetar uma reação antígeno-anticorpo e obter um diagnóstico etiológico, isto é, identificar o agente causador e determinar a concentração. Podem usar-se diversos tipos de metodologias, como a reação de precipitação (assenta na capacidade de ligação multivalente de cada anticorpo) e a reação de aglutinação (tal como na reação de precipitação, assenta na capacidade de ligação multivalente de cada anticorpo, as partículas revestidas com um antígeno aglutinam se estiver presente o anticorpo que lhe é específico) e utilização de corantes ou substâncias marcadoras para revelar a reação. Na Tabela V estão representados os testes serológicos realizados no laboratório e o uso/objetivo de cada um.

Tabela V - Teste serológicos realizados no Laboratório

Teste	Uso
Reação VDRL	Diagnóstico laboratorial de sífilis.
Reação de Waaler-Rose	Deteção qualitativa e semi-quantitativa do fator reumatóide no soro humano.
Reação de Weil-Felix	Doentes infetados por <i>Rickettsia</i> podem aglutinar suspensões de estirpes de <i>Proteus</i> (bactéria usado no diagnóstico diferencial da carraça).
Rosa de Bengala	Pesquisa da presença de anticorpos anti-Brucella no soro dos doentes com suspeita de Brucelose.
Reação de Paul-Bunnell	Deteta a infeção pelo vírus Epstein-Barr, o qual causa a Mononucleose Infeciosa.
Reação de Widal	Permite o diagnóstico de febre tifóide (<i>Salmonella typhi</i>) e paratifoide (<i>Salmonella paratyphi</i> A, B ou C).
Reação de Wright	Deteta brucelose, usando o antígeno da <i>Brucella abortus</i> para detetar anticorpos anti-B. <i>abortus</i> .

Realizei as tarefas desde a receção das amostras, o processamento e o acompanhamento na validação de resultados. Realizei manutenções diárias e ainda auxiliiei e acompanhei a calibração e controlo de alguns equipamentos. No geral, integrei a rotina do laboratório. À exceção de tratar das hemoculturas, fazer gasometrias e a eletroforese de proteínas séricas, contudo acompanhei o processamento de cada uma.

Setor da Hematologia

Neste setor realizei manutenções e controlos diários dos equipamentos. Particpei no manuseamento das amostras biológicas: receção no laboratório, trabalhei com os equipamentos e ao acompanhei na validação analítica. Na validação analítica adquiri conhecimentos dos critérios de validação de resultados para ter noção de quando é necessário repetir análises ou fazer esfregaço sanguíneo, na hipótese de os resultados serem valores críticos. Realizei a coloração de Wright em esfregaços sanguíneos e a observação dos mesmos, nos momentos em que havia mais disponibilidade. Desta forma, integrei a rotina do laboratório, fazendo as variadas tarefas nesta área. No Laboratório Germano de Sousa do Hospital CUF Viseu são determinados parâmetros, que auxiliam o clínico no diagnóstico de alterações e/ou doenças hematológicas, tais como: o hemograma, quantificação de reticulócitos, determinação da velocidade de sedimentação eritrocitária (VSE), determinação de hemoglobina glicada (HbA1c), parâmetros de coagulação (hemóstase), entre os quais tempos de coagulação (TP e aPTT) e D-Dímeros.

A Hematologia é a ciência que estuda o sangue. É um dos produtos biológicos mais utilizados no âmbito das Análises Clínicas por ser um fluido de fácil acesso. Os glóbulos vermelhos, os glóbulos brancos e as plaquetas constituem 45% do volume sanguíneo, sendo esta a componente celular do sangue, os elementos figurados. Os restantes 55% constituem a componente líquida, o plasma. Este é constituído maioritariamente por água onde estão presentes componentes orgânicos – várias proteínas (albumina, globulinas, fibrinogénio, etc.), glucose e ácidos gordos – e componentes inorgânicos – cloro, iodo, fósforo, potássio, sódio, etc.

Para além de estudar as células sanguíneas quanto à morfologia e percentagem relativa dos elementos figurados do sangue, o setor de Hematologia estuda também os órgãos hematopoiéticos, a hematopoiese e a hemóstase. Permite identificar alterações sistémicas, que contribuem para o diagnóstico de doenças hematológicas, bem como a monitorização terapêutica dos doentes hipocoagulados para ajudar o clínico a ajustar a terapêutica do(a) doente sempre que necessário. É nesta área que se encontra um dos exames mais pedidos pelos clínicos – o hemograma – seguido da velocidade de sedimentação eritrocitária.

Hemograma

O hemograma refere-se ao exame que abrange a contagem de plaquetas, eritrócitos e índices eritrocitários, leucócitos e a contagem diferencial dos leucócitos. Para além da contagem abrange o estudo da morfologia dos constituintes sanguíneos, que pode ser uma ferramenta muito importante no diagnóstico e evolução de doenças hematológicas. A amostra

usada no hemograma é o sangue total colhido para um tubo, de tampa roxa, com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) sódico ou potássico, que na quantidade certa impede a coagulação dos componentes celulares, assim como alterações morfológicas, uma vez que o EDTA faz a quelatação de íons, entre eles o cálcio, Ca^{2+} , impedindo a coagulação e a agregação plaquetária. Tal como todas as amostras, estas também devem ser processadas o mais rápido possível, depois de devidamente homogeneizadas. (Hoffbrand e Moss, 2016)

Sysmex XT-1800i e Sysmex XT-4000i

No Laboratório Germano de Sousa do Hospital CUF Viseu, os analisadores hematológicos automatizados usados para a determinação do hemograma são o Sysmex XT-1800i e o Sysmex XT-4000i. Ambos utilizam a tecnologia de citometria de fluxo fluorescente com laser semiconductor e foco hidrodinâmica. Esta tecnologia faz com que haja maior sensibilidade na diferenciação entre classes celulares sanguíneas normais, das anormais, diminuindo o número de revisões manuais e, por isso poupa tempo. Realizam a contagem de leucócitos, plaquetas e eritrócitos no sangue total e em líquidos biológicos, como líquido cefalorraquidiano, sinovial e serosos. A marcação por fluorescência revela a relação núcleo-citoplasma em cada célula corada individualmente, permitindo diferenciar em seis populações de leucócitos. A combinação da dispersão lateral de luz (complexidade celular), da dispersão frontal (volume celular) e da fluorescência (quantidade de material genético – DNA/RNA) diferencia as classes leucocitárias. Esta análise tridimensional dos leucócitos fornece resultados exatos e precisos.

O Sysmex XT-4000i usa ainda uma segunda metodologia para contagem de plaquetas, a citometria de fluxo fluorescente, permitindo uma contagem de plaquetas mais precisa quando o método de impedância apresenta interferência. A vantagem deste equipamento perante o Sysmex XT-1800i é a realização da contagem de reticulócitos, que é totalmente automatizada e não necessita de preparação prévia da amostra. A população de reticulócitos também é analisada e reportada pelo parâmetro de Fração de Reticulócitos Imaturos (IRF), que fornece informações sobre a atividade medular. Usa, ainda, sete parâmetros que inclui a contagem de células mononucleares e polimorfonucleares nos líquidos biológicos.

Como já foi referido, o hemograma abrange a contagem de plaquetas, eritrócitos e índices eritrocitários, leucócitos e a contagem diferencial dos leucócitos, assim como o estudo da morfologia dos constituintes sanguíneos. Na Tabela VI estão representados os parâmetros determinados num hemograma, as respetivas unidades e o significado de cada abreviatura.

Tabela VI - Parâmetros determinados no Hemograma

Parâmetro (Unidades)	Definição
Eritrograma	
RBC ($\times 10^{12}/L$)	Contagem de Eritrócitos
HGB (g/dL)	Concentração da Hemoglobina
HTC (%)	Hematócrito
MCV (fL)	Volume Corpuscular Médio
MCH (pg)	Hemoglobina Corpuscular Média
MCHC (g/dL)	Concentração Média de Hemoglobina Corpuscular
RDW (%)	Dispersão do Volume Eritrocitário
Leucograma	
WBC ($\times 10^9/L$)	Contagem de Leucócitos
NEU ($\times 10^9/L$)	Neutrófilos
LYM ($\times 10^9/L$)	Linfócitos
MONO ($\times 10^9/L$)	Monócitos
EOS ($\times 10^9/L$)	Eosinófilos
BASO ($\times 10^9/L$)	Basófilos
Plaquetograma	
PLT ($\times 10^9/L$)	Contagem de Plaquetas
MPV (fL)	Volume Plaquetar Médio
PDW (%)	Dispersão do Volume Plaquetar

Fonte: (Hoffbrand e Moss, 2016)

Eritrócitos

O eritrócito é uma célula altamente especializada, cuja função principal é o transporte do oxigénio aos tecidos. São células anucleadas, em forma de disco bicôncavo, que possuem um citoplasma acidófilo devido à presença de hemoglobina. Têm uma média de vida de 120 dias. Os glóbulos vermelhos têm na sua constituição uma proteína globular, a hemoglobina. Tal como se pode observar na Figura 2, a hemoglobina trata-se de um tetrâmero constituído por dois pares de cadeias polipeptídicas, α , β , γ e/ou δ , ligadas por ligações não covalentes. Contudo, cada cadeia está ligada covalentemente a um grupo heme. Nos adultos, a hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$) constitui

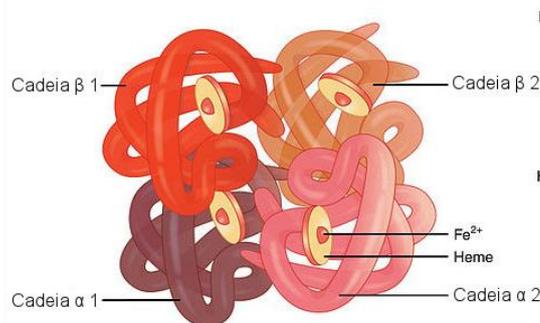


Figura 2 - Molécula da Hemoglobina

Fonte da figura:

https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/24978/1/TM_Laura_Lavouras_Monografia.pdf

cerca de 97% do total da hemoglobina, a hemoglobina A₂ (α₂δ₂) representa 2-3% e a hemoglobina F (fetal, α₂γ₂), que predomina na vida fetal, diminui ao longo do primeiro ano de vida e, no adulto tem um valor residual, menos de 1%.

A eritropoiese é o processo de produção de eritrócitos. Este processo ocorre na medula óssea e depende da integridade da mesma, da presença de fatores de crescimento, especialmente a eritropoietina – produzida maioritariamente no rim (90%) e no fígado (10%) – e de elementos essenciais como ferro, folato e vitamina B₁₂. Em situações de hipoxia, o rim secreta a eritropoietina, que estimula a proliferação e diferenciação das células da linhagem eritrocitária, dando origem aos eritrócitos.

Na contagem de eritrócitos podem acontecer alterações. Uma diminuição da contagem – eritrocitopenia – e quando acompanhado da diminuição da hemoglobina podemos estar perante casos de anemia, distúrbios medulares, doenças renais. Um aumento da contagem – eritrocitose – quando acompanhado do aumento do hematócrito e hemoglobina indica uma poliglobulia (aumento exagerado na quantidade de glóbulos vermelhos), em que as causas podem ser tumores produtores de eritropoietina ou Policitemia Vera – doença genética que aumenta a sensibilidade da medula óssea à eritropoietina.

Índices eritrocitários

Os índices eritrocitários obtidos através do hemograma são calculados de forma automática pelo equipamento através de diversas fórmulas e dos parâmetros RCB (contagem de glóbulos vermelhos), HGB (hemoglobina) e HCT (hematócrito (% ou L/L) – é a percentagem/volume de eritrócitos, no volume de sangue total. Correlaciona-se com a viscosidade sanguínea). (Theml, Diem e Haferlach, 2004)

Volume Corpuscular Médio (MCV) determina o volume médio de cada eritrócito. Permite avaliar os tipos de anemias: microcítica, normocítica e macrocítica.

$$MVC = \frac{\text{hematócrito L/L}}{\text{eritrócitos } \times 10^{12}/L} \quad (\text{fl})$$

Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) corresponde ao conteúdo médio de hemoglobina por eritrócito. Permite o diagnóstico de anemias: hipocrómicas e normocrómicas.

$$HCM = \frac{\text{hemoglobina g/L}}{\text{eritrócitos } \times 10^{12}/L} \quad (\text{pg})$$

Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) corresponde ao índice calculado a partir do valor da hemoglobina e hematócrito, significando a quantidade de hemoglobina média percentual está contida em cada eritrócito.

$$\text{CHCM} = \frac{\text{hemoglobina g/L}}{\text{hematócrito L/L}} \quad (\text{g/L})$$

Dispersão do Volume Eritrocitário (RDW) corresponde à amplitude de distribuição do tamanho dos eritrócitos, isto é, permite avaliar a anisocitose.

A anemia consiste na diminuição da concentração de hemoglobina no sangue periférico, consoante o género e a idade do indivíduo. A concentração de hemoglobina (g/dL) determina-se nos equipamentos automatizados e obtém-se após a oxidação da hemoglobina em cianometaglobina.

Quando o MCV for inferior a 80 fl e HCM inferior a 27 pg considera-se uma anemia microcítica e hipocrómica, sendo a principal causa deste tipo de anemias a deficiência de ferro. Quando o MCV se encontra entre 80 e 95 fl e uma HCM superior a 26 pg caracteriza-se por uma anemia normocítica e normocrómica, onde se incluem as anemias hemolíticas. Por fim, quando o MCV é superior a 95 fl trata-se de uma anemia macrocítica, que se divide em anemia macrocítica megaloblástica e anemia macrocítica não megaloblástica. Então, consoante o MCV e HCM obtém-se as seguintes classificações das anemias: (Hamid, 2014)

Tabela VII - Classificações das anemias

	Anemia microcítica e hipocrómica	Anemia normocítica e normocrómica	Anemia macrocítica	
	MCV < 80 fl HCM < 27 pg	MCV 80 – 95 fl HCM > 26 pg	MCV >95 fl	
			Megaloblástica	Não megaloblástica
Causas	Anemia por deficiência de ferro, Anemia Sideroblástica, Talassémias, Anemia das Doenças Crónicas, Intoxicação pelo chumbo	Anemias hemolíticas, Hemorragias agudas, Doença renal, Falência medular	Deficiência em Vitamina B12 e em ácido fólico, Anemia Perniciosa	Álcool, Fármacos, Anemia aplástica, Mielodisplasia, Hepatopatias

As alterações na forma – poiquilocitose – e tamanho – anisocitose – do eritrócito podem estar na origem de patologias associadas à morfologia anormal do eritrócito, que contribui para a diminuição do tempo de vida do eritrócito e, conseqüentemente para diminuição do transporte de oxigénio dos pulmões para os tecidos e a retirada de dióxido de carbono dos tecidos para os pulmões.

Embora seja relevante avaliar as alterações qualitativas e quantitativas, ao contrário dos leucócitos e plaquetas, nos eritrócitos é difícil avaliar as alterações quantitativas, mas a avaliação do tamanho, da forma, da presença de inclusões ou de aglutinação dos eritrócitos podem fornecer informações muito úteis para o diagnóstico.

Nas alterações de tamanho (anisocitose) temos a microcitose, ou seja, o eritrócito tem tamanho inferior ao normal, o micrócito. Pelo contrário, temos a macrocitose, o eritrócito tem tamanho superior ao normal, o macrócito. Os macrócitos podem ser arredondados ou ovais com significados clínicos diferentes. A presença de macrocitose pode ser decorrente de reticulocitose, uma vez que os reticulócitos são maiores do que os glóbulos vermelhos maduros. A contagem de reticulócitos pode, portanto, auxiliar no diagnóstico desses casos, porque quando elevada sugere hemólise. Se não estiver elevada, pode ocorrer por deficiência de vitamina B₁₂ ou ácido fólico.

As alterações na coloração do interior da hemácia, apresentando maior ou menor coloração, hiper Cromia e hipocromia, respetivamente. Quando ocorre redução do conteúdo da hemoglobina, a área de palidez central aumenta. Como a hemoglobina é constituída por quatro grupos heme, onde está localizado o ferro, e por quatro cadeias globínicas, quando há redução da síntese de heme ou das cadeias globínicas, há diminuição na produção da hemoglobina e a hemácia torna-se hipocrómica. A policromasia é o termo que descreve a coloração rosa-azulada dos eritrócitos imaturos, isto é, reticulócitos jovens. Devido à presença de RNA ribossómico e hemoglobina, absorvem corantes básicos e eosina e são libertados devido aos altos níveis de eritropoietina, que estimula a medula óssea e leva à libertação dos reticulócitos.

As alterações na forma ocorrem por diversas condições, desde a produção de eritrócitos anormais à lesão das células na circulação na corrente sanguínea. Algumas são típicas de determinadas doenças, outras são mais gerais.

Os esferócitos sofrem uma alteração da forma do glóbulo vermelho devido à alteração na constituição proteica da membrana, diminuindo a biconcavidade. Esta situação apresenta-se na Esferocitose Hereditária.

Os eliptócitos ou ovalócitos são eritrócitos que apresentam forma ovalada ou eliptocítica devido a defeitos genéticos nas proteínas do citoesqueleto da célula.

As células em alvo ou Target Cell (Codócitos) apresentam-se como células que possuem uma zona descorada em redor a um ponto central corado, devido à modificação do conteúdo em lípidos, isto é, devido ao aumento de colesterol e de fosfolípidos, resultando numa elevada relação superfície/volume celular. Apresenta como causas hemoglobinopatias, talassemias, esplenotomia e anemia por deficiência de ferro.

Os dacriócitos são eritrócitos em forma de gota ou lágrima. Comum na mielofibrose e na hematopoiese extramedular.

A célula falciforme ou Sickle cell – Os eritrócitos adquirem forma de foice devido à presença de hemoglobina S, por isso não transportam de forma adequada o oxigénio. Os eritrócitos em forma de foice são frágeis e fragmentam-se facilmente, contudo são rígidas, tornando-se menos deformáveis e tendem a obstruir os vasos sanguíneos, diminuindo o fornecimento de oxigénio para os tecidos nessas regiões obstruídas. Estas células são muito comuns na depreanocitose ou anemia falciforme.

O estomatócito são eritrócitos com halo central semelhante a boca de peixe. É uma condição rara, mas pode estar associada a hepatopatias, ao alcoolismo, entre outras.

Nas células espiculadas os equinócitos ou hemácias crenadas são glóbulos vermelhos com a membrana irregular, apresentando dez a trinta espículas distribuídas regularmente. Encontrado em hepatopatias, pós-esplenectomia, mas também pode ser encontrada em caso de uso de heparina ou artefactos em lâminas por substâncias alcalinas. Os acantócitos são eritrócitos com duas a vinte espículas dispostas irregularmente e de diversos tamanhos sobre a superfície da célula. A alteração da forma do glóbulo vermelho dá-se pela modificação do conteúdo em lípidos, isto é, devido a um aumento seletivo do colesterol. As causas passam por doença hepática, insuficiência renal ou abetalipoproteinémia. Por último, os esquizócitos são fragmentos eritrocitários que se encontram em muitas patologias sanguíneas. Podem resultar da perda de parte do eritrócito normal. Na Figura 3, estão representadas algumas das

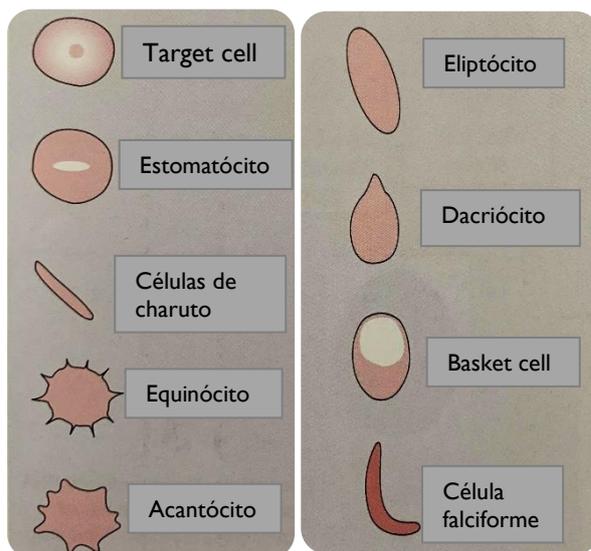


Figura 3 – Alterações na forma do eritrócito

Fonte da figura: HOFFBRAND, A. Victor; MOSS, Paul A. H. - **Hoffbrand's Essential Haematology**. 7. ed. Chichester : Ltd, John Wiley & Sons, 2016. ISBN 978-1-118-40867-4.

variações mais frequentes na forma (poiquilocitose), que podem ser encontradas em diferentes anemias.

As células vermelhas podem apresentar inclusões devido à presença de remanescentes de material nuclear ou de mitocôndrias ou à presença de microrganismos no seu interior.

Os corpos Howell-Jolly são constituídos por DNA remanescente no interior dos eritrócitos. Em indivíduos normais não são vistos no sangue periférico, uma vez que são removidos pelo baço. No entanto, em indivíduos com problemas a nível do baço ou após esplenectomia, aparecem em grande número. Assim como nos recém-nascidos, uma vez que o baço é imaturo.

O pontuado basofílico consiste em pequenos e numerosos grânulos basofílicos que contêm RNA, devido à deficiência hereditária de pirimidina 5'-nucleotidase (enzima necessária à degradação de RNA) e pode surgir em anemias hemolíticas, intoxicações por metais pesados, deficiências nutricionais, entre outros.

Os corpúsculos de Pappenheimer são inclusões basofílicas, pequenas, compostas de hemossiderina presentes na periferia da célula que correspondem aos grânulos sideróticos dos siderócitos. Estão presentes na sobrecarga de ferro e no hipoesplenismo.

Os eritrócitos, quando revestidos por anticorpos, podem aglutinar-se. A aglutinação é a formação de aglomerados irregulares de células. Nestes casos, os índices eritrocitários, como os MCV e MCH dão resultados falsamente elevados, uma vez que os glóbulos aglutinados são medidos como uma única célula. Pode ser observada em casos de contacto com medicamentos intravenosos veiculados em óleos como miconazol ou ciclosporina. Quando há aumento de proteínas plasmáticas de alto peso molecular, como as imunoglobulinas, as hemácias podem empilhar-se, como se fossem pilhas de moedas devido às alterações da carga da superfície dos eritrócitos, favorecendo a sua agregação. Este fenómeno é designado por Rouleaux.

Os eritroblastos são células jovens, precursoras dos eritrócitos, que quando presentes na circulação periférica no decurso uma produção medular exageradamente aumentada, devido a grandes processos regenerativos eritrocitários, na medida em que as hemácias são destruídas ou na infiltração medular. Esta situação pode surgir numa anemia hemolítica.

Reticulócitos

São células precursoras dos eritrócitos, que têm características semelhantes à célula madura, mas com RNA remanescente no citoplasma que, apesar de não ter núcleo, ainda tem a capacidade de produção de hemoglobina. A medula óssea produz novas células para

substituir as que são perdidas todos os dias. Nos primeiros três dias de maturação dos reticulócitos ocorrem na medula óssea e ao quarto dia são libertados na corrente sanguínea para finalizarem o processo de maturação, onde perdem os organelos e adquire o formato bicôncavo e cor característico de um eritrócito maduro.

A contagem de reticulócitos não é um parâmetro normal de um hemograma e só é realizado quando é pedido pelo clínico. O resultado é expresso em percentagem (%), número de reticulócitos por 100 eritrócitos e valor absoluto.

Apesar de não ser um parâmetro de rotina, a contagem de eritrócitos é muito importante, uma vez que avalia a produção de eritrócitos, permitindo o conhecimento do funcionamento da medula óssea.

A diminuição do número de reticulócitos, reticulocitopenia, está associado a uma situação hipoproliferativa, como por exemplos: supressão da medula óssea por quimioterapia citotóxica ou outros medicamentos que a afetem, deficiência de vitamina B₁₂, ferro ou ácido fólico, leucemia aguda, anemia aplástica, entre outros.

O aumento do número de reticulócitos, reticulocitose, está associado a uma situação hiperproliferativa, como por exemplos: anemia hemolítica, hemorragias, administração de eritropoietina, síndromes mieloproliferativas, resposta à terapêutica de um indivíduo com deficiência de vitamina B₁₂, ferro ou ácido fólico e indica uma recuperação da medula óssea após tratamentos de quimioterapia.

Leucócitos

Na Figura 4, através da célula estaminal, que se diferencia e origina na linhagem mieloide (eritrócitos, plaquetas, basófilos, eosinófilos, neutrófilos e monócitos) e na linhagem linfoide se diferencia em linfócitos B e T e células NK (*Natural Killer*).

Os leucócitos constituem uma parte importante na defesa do organismo contra substâncias estranhas ao sistema imunológico. Estas células são produzidas sobretudo na medula óssea, que amadurecem e se diferenciam em granulócitos (neutrófilos, basófilos e eosinófilos) e em mononucleares (monócitos e linfócitos) (Figura 5).

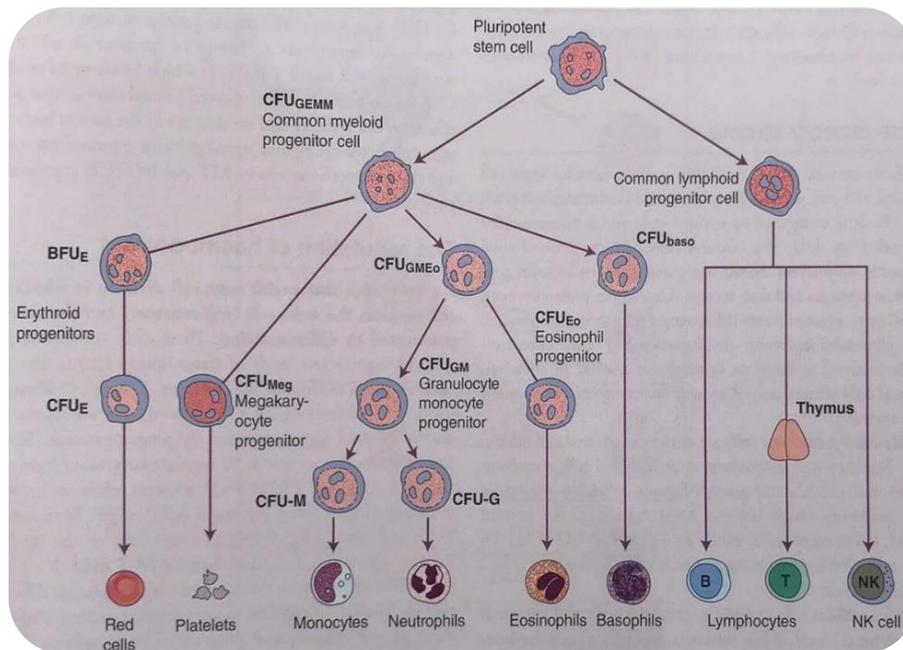


Figura 4 - Esquema da Hematopoiese

Fonte da figura: HOFFBRAND, A. Victor; MOSS, Paul A. H. - **Hoffbrand's Essential Haematology**. 7. ed. Chichester : Ltd, John Wiley & Sons, 2016. ISBN 978-1-118-40867-4.

Apesar de terem este papel de defesa no organismo, por vezes há situações que levam à alteração da forma e número de glóbulos brancos e, desta forma estarem associadas a determinadas patologias.

Um adulto tem cerca de $4.0-10.0 \times 10^9/L$ leucócitos, contudo há fatores que alteram a contagem de leucócitos. A leucopenia, diminuição do número de glóbulos brancos para valores inferiores ao intervalo de referência, deixa as pessoas mais suscetíveis a infeções. Já na leucocitose, o aumento no número de glóbulos brancos acima do intervalo de referência, acontece quando o organismo tenta combater uma infeção, em situações de leucemia ou pela libertação de leucócitos imaturos ou anormais da medula óssea para a corrente sanguínea. É importante salientar que citopenias e citoses relativas nada significam se não forem acompanhadas de citopenias e citoses absolutas.

Os neutrófilos, os granulócitos mais comuns, contêm três a cinco lóbulos e um citoplasma acidófilo. Atuam na defesa primária do organismo em processos inflamatórios, devido a características próprias como a fagocitose, quimiotaxia, motilidade. Neutropenia, diminuição do número de neutrófilos, pode surgir em indivíduos de etnia africana, em síndromes mielodisplásicas, em infeções virais, bacterianas, fúngicas. Estão ainda associadas ao uso de drogas e alcoolismo. O aumento do número absoluto de neutrófilos no sangue designa-se por neutrofilia e deve-se a infeções bacterianas agudas e crónicas, hemorragia aguda, tabagismo, leucemias e síndromes mieloproliferativas, doenças metabólicas e necrose tecidual.

Os basófilos estão implicados em reações alérgicas. São células com o núcleo lobulado (dois a três lóbulos) e cromatina densa. Contêm grânulos citoplasmáticos negros que contêm heparina e histamina. A alteração que surge nestas células é o aumento do número absoluto de basófilos – basofilia. Ocorre em situações de Leucemia mieloide crónica,

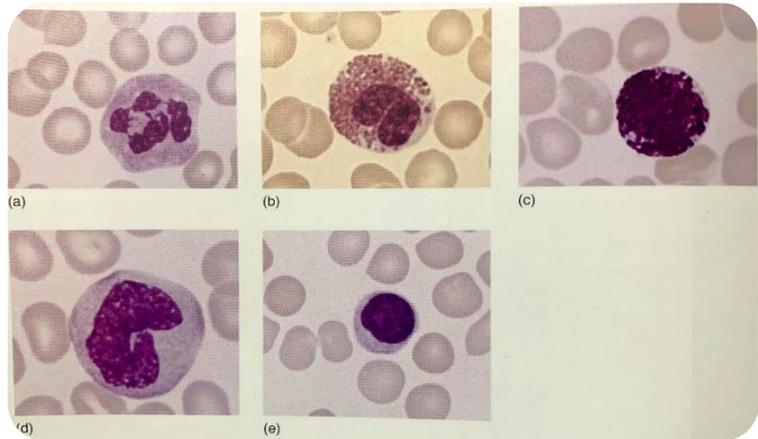


Figura 5 - Glóbulos brancos (leucócitos): a) neutrófilo; b) eosinófilo; c) basófilo; d) monócito; e) linfócito

Fonte da figura: HOFFBRAND, A. Victor; MOSS, Paul A. H. - **Hoffbrand's Essential Haematology**. 7. ed. Chichester : Ltd, John Wiley & Sons, 2016. ISBN 978-1-118-40867-4.

reações de hipersensibilidade, hipotireoidismo, sideropenia, Policitemia Vera, infeções (sinusite crónica, varicela, varíola).

Os eosinófilos são células com núcleo lobulado (dois lóbulos), cromatina densa e citoplasmas com granulações eosinófilas. Aumentam em resposta a reações alérgicas e a infeções parasitárias. Removem a fibrina formada durante a inflamação. A eosinopenia, diminuição do número absoluto de eosinófilos, pode ocorrer em infeções agudas e na síndrome de Cushing. Pelo contrário a eosinofilia, aumento do número absoluto de eosinófilos, pode observar-se em infeções parasitárias, reações alérgicas, abuso de drogas, intoxicação por metais pesados, por exemplo o chumbo. (Hamid, 2014)

Os linfócitos são células pequenas com núcleo redondo ou oval e cromatina densa. Citoplasma basófilo com ausência ou presença de grânulos azurófilos. Os linfócitos diferenciam-se em linfócitos B (diferenciam-se em plasmócitos), em linfócitos T (auxiliares ou citotóxicos) e linfócitos NK – células *Natural Killer* – (imunidade inata). A linfopenia, diminuição do número absoluto de linfócitos, pode ocorrer no Linfoma de Hodgkin, terapia com eritropoietina, anemia aplástica. Já a linfocitose, aumento do número absoluto de linfócitos, pode observar-se em infeções bacterianas e virais (sarampo, varicela e mononucleose infecciosa), Linfocitose Infecciosa Aguda, Leucemia Linfocítica Crónica. Outra alteração relativa aos linfócitos, são os Linfócitos Atípicos. Apresentam citoplasma mais basofílico do que o linfócito normal, tem um núcleo grande e parecem “abraçar” os eritrócitos. Aparecem em grande número na Mononucleose Infecciosa.

Por último, os monócitos são as maiores das células sanguíneas. Contêm um núcleo oval, ou reniforme, ou lobulado, com citoplasma contendo granulações finas e azurófilas, com

ou sem vacúolos. Diferenciam-se em macrófagos nos tecidos e têm função fagocítica. A monocitose corresponde ao aumento absoluto do número de monócitos. Ocorre em infecções provocadas por bactérias e micobactérias (tuberculose), na Malária, artrite reumatóide e na Leucemia Mielomonocítica Crônica, doenças granulomatosas (Sarcoidose), carcinomas da mama, ovário, próstata, doenças do colagênio.

Plaquetas

Na medula óssea, por ação da trombopoietina, a linhagem mieloide leva à megacariopoiese, originando as plaquetas. São fragmentos do megacariócito de tamanho muito reduzido, forma irregular e anucleados. Têm um papel fundamental na hemóstase, uma vez que são exclusivamente pró-coagulantes.

O número de plaquetas pode ser normal ou variável. Alterações observadas na contagem plaquetária são: agregados plaquetários, plaquetas gigantes, satelitismo plaquetário e aumento e diminuição do número de plaquetas, trombocitose e trombocitopenia, respectivamente.

Os agregados plaquetários determinam falsamente a contagem das plaquetas, uma vez que dão um número de plaquetas inferiores ao real. Nesses casos esta situação deve confirmar-se através de um esfregaço sanguíneo.

O tamanho das plaquetas pode ser avaliado por comparação com o diâmetro com os eritrócitos e no caso das plaquetas gigantes, que podem ser do tamanho dos eritrócitos, pode observa-se na doença mielodisplásica e na trombocitopenia hereditária.

No caso do satelitismo plaquetário há formação de “rosetas” em torno dos neutrófilos, mas também de monócitos e eosinófilos. O EDTA expõe e proporciona a ligação de anticorpos anti-criptoantigénios da GPIIb/IIIa promovendo a aglutinação das plaquetas. Para evitar esta situação o sangue é colhido para um tubo com citrato de sódio ou heparina.

A trombocitose pode surgir em resposta a diversos tumores, inflamações crônicas, Policitemia Vera, situações de deficiência de ferro. Por outro lado, a trombocitopenia advém da redução na produção de plaquetas – álcool, Síndrome de Sebastian, Síndromes mielodisplásicas –, aumento do consumo ou da destruição - uso de drogas, tromboembolismo venoso, infecções virais e bacterianas, coagulação intravascular disseminada – e uma redistribuição anormal de plaquetas, por exemplo em casos de hipotermia.

Esfregaço sanguíneo periférico

Apesar de os equipamentos estarem cada vez mais sofisticados, os esfregaços sanguíneos periféricos (ESP) continuam a ser efetuados, embora em menor número. Contudo, só dessa forma é que é possível observar todas as alterações qualitativas e quantitativas descritas anteriormente. É realizado sempre que é prescrito pelo clínico, quando existem valores críticos/anormais no hemograma, ou histórico clínico do paciente. É importante visualizar os histogramas e estar atento a possíveis alarmes – “Flags” – que o equipamento possa emitir.

No Laboratório Germano de Sousa de Viseu, ao contrário do que sucede na sede em Lisboa em que o processo é automatizado, é uma técnica manual, desde à realização do esfregaço, a sua colocação e observação microscópica. Tal como representa a Figura 6, após a homogeneização da amostra, com o auxílio de uma pipeta retira-se uma gota de sangue para uma lâmina limpa e desengordurada e com uma lamela, a 45°, arrasta-se essa gota, ficando uma película fina.

Ângulos superiores a 45° produzem ESP espessos e curtos, dificultando a visualização microscópica. Assim como um mau esfregaço, que pode levar ao aparecimento de artefactos e dificultar a observação microscópica.

Depois de secar, procede-se à coloração, a de Wright. Esta coloração é uma modificação da coloração de Romanovsky, é uma técnica, que utiliza a combinação de corante ácido (eosina) e o corante básico (azul de metileno). É uma técnica de coloração eletiva para a diferenciação dos tipos celulares no esfregaço de sangue periférico, medula óssea ou para o estudo citológico de elementos celulares provenientes de outros produtos biológicos.

Após a coloração feita, deixar secar e depois proceder à visualização ao microscópio ótico. A observação inicia-se com a objetiva de menor ampliação (10x) para obter um bom campo de observação. Segue-se a objetiva de 40x (pequena ampliação) em que se verifica a qualidade do esfregaço e da coloração e se escolhe o campo para a visualização, onde os eritrócitos não estão sobrepostos e ligeiramente afastados. Nesta ampliação é possível observar agregados plaquetários, parasitas, eritrócitos aglutinados e eritrócitos em *rouleaux*. Na objetiva de 100x (grande ampliação – imersão em óleo) é possível fazer uma contagem diferencial de leucócitos, na qual se contam 100 leucócitos consecutivos e se fazem as percentagens de cada

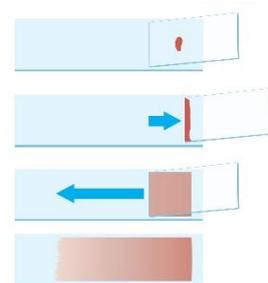


Figura 6 - Técnica de esfregaço sanguíneo periférico

Fonte da figura:
<https://kasvi.com.br/esfregaco-de-sangue->

classe, verificar anomalias morfológicas dos leucócitos, eritrócitos e plaquetas e tem-se especial atenção à presença de células imaturas.

Hemóstase

A hemóstase é um processo fisiológico complexo que protege o sistema vascular de uma lesão, com reparação de tecidos e restabelecimento de funções. É o conjunto de mecanismos que, de modo integrado, contribuem para rapidamente parar a hemorragia, atuando localmente e de modo autolimitado, de forma a não comprometer o normal fluxo sanguíneo.

Os componentes da hemóstase incluem plaquetas, células endoteliais (parede do vaso) e proteínas plasmáticas (fatores de coagulação, inibidores da coagulação e sistema fibrinolítico).

Este processo é regulado por três mecanismos: hemóstase primária, hemóstase secundária ou coagulação e fibrinólise.

Na hemóstase primária o objetivo é parar a hemorragia e para isso há formação de um trombo plaquetar nos locais da lesão. Quando o vaso sofre uma lesão a resposta que o organismo dá é a vasoconstrição, que faz com que o fluxo sanguíneo diminua e, por isso limita a perda excessiva de sangue.

Na hemóstase secundária ou coagulação o objetivo é parar o processo de formação do coágulo quando este já não é necessário, ou seja, inibir a coagulação. Nesta fase há a ativação do sistema procoagulante, através dos fatores de pró-coagulantes, conjunto de proteínas que atuam de modo integrado, com o apoio de superfícies celulares, com o objetivo de formar a fibrina e a ativação do sistema inibidor, levando à formação de um coágulo de fibrina insolúvel.

A cascata de coagulação, representada na Figura 7, é ativada por duas vias: Via Intrínseca ou de Contacto e a Via Extrínseca ou Tecidual, que acabam por culminar na Via Comum, que leva à formação de trombina. Esta separação das vias só se verifica *in vitro*, porque, na realidade, ambas não são independentes uma da outra.

Por último, ocorre a dissolução do coágulo devido à ativação da fibrinólise. A

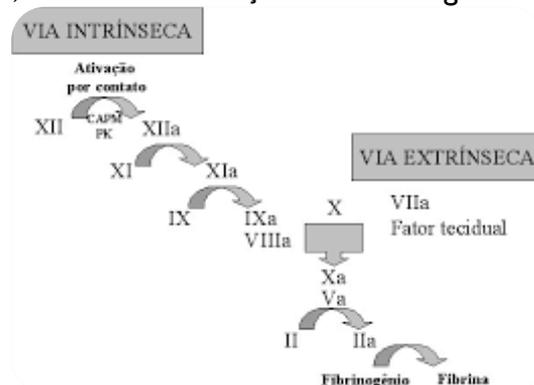


Figura 7 - Cascata de Coagulação

Fonte da figura:

https://pt.slideshare.net/Love_Pharmacy/disturbios-da-coagulao (adaptada)

remoção do excesso da fibrina ocorre de modo a não comprometer o normal fluxo sanguíneo. Horas depois da lesão do vaso sucede-se a lise do coágulo.

Para os estudos da coagulação é necessária uma amostra de sangue total para um tubo com anticoagulante Citrato de Sódio na proporção 1:9 (anticoagulante: sangue) para obtenção de plasma. Após a colheita deve ser centrifugado a 3000 rpm durante 15 minutos e ser processado o mais rápido possível para garantir a qualidade de resultados. Para estudos que envolvam plaquetas, os testes devem ser efetuados nas duas horas após a colheita.

Sysmex CA-500

Este é o equipamento de coagulação do Laboratório Germano de Sousa do Hospital CUF Viseu. Este equipamento automatizado permite a análise de múltiplos parâmetros: Tempo de Protrombina, Tempo de Tromboplastina parcial ativada, Fibrinogénio e Tempo de Trombina e diversos fatores específicos da coagulação.

Tempo de Protrombina (TP)

Mede o tempo de coagulação na presença de uma concentração ótima de extrato tecidual (Tromboplastina) e cálcio adicionados à amostra de plasma citratado. Indica a eficiência global da Via Extrínseca, avalia a hemóstase e a função hepática e monitorização de terapêutica com anticoagulantes orais. Dessa forma determina deficiências congénitas ou adquiridas de fatores da Via Extrínseca (fator VII) e da Via Comum (fatores X, V, II e fibrinogénio). Portanto, quando o Tempo de Protrombina aumenta isoladamente há uma deficiência no fator VIIc.

O resultado é dado em I.N.R (International Normalised Ratio) é a razão entre o TP do doente e o TP de controlo, elevado ao índice de sensibilidade internacional (ISI). O ISI é determinado comparando com cada reagente com a tromboplastina padrão definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

A INR foi introduzida pela OMS para padronizar o controlo do tratamento com anticoagulantes orais. O valor normal é entre 0,9 a 1,1, isto é, para um indivíduo que não faça terapia. Para um indivíduo que esteja a realizar terapêutica oral é expectável que o valor de INR varie, na maioria dos casos, entre 2,0 e 3,0.

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

Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (aPTT)

Mede o tempo de coagulação do plasma, depois da ativação dos fatores de contacto (sem adição do fator tecidual) e na presença dos fosfolípidos que padroniza o início da coagulação pela rápida ativação do fator XII. Desta forma indica globalmente a eficácia da Via Intrínseca (fatores XII, XI, IX, VIII) e da Via Comum (fatores X, V, II e Fibrinogénio).

A medição do aPTT deteta deficiências congénitas ou adquiridas de fatores das Vias Intrínseca e Comum, monitorização da terapêutica com heparina clássica e pesquisa de Anticoagulante Lúpico.

Tempo de Trombina (TT)

Prova de coagulação que determina o tempo necessário para a conversão do fibrinogénio em fibrina, ativado pela trombina. O intervalo da normalidade é entre 15 a 18 segundos. O TT encontra-se normal em situações de défices de fatores de coagulação, exceto o fibrinogénio e no Anticoagulante Lúpico. Apresenta-se prolongado em situações de contaminação com heparina, hipofibrinogénemia e disfibrinogénemia. Contudo, não é diagnóstico pelo que deverá sempre fazer-se o doseamento de fibrinogénio.

Fibrinogénio

O fibrinogénio é uma proteína de fase aguda dimérica sintetizada no fígado e está envolvida na parte final da coagulação, que pela ação da trombina converte o fibrinogénio em fibrina. Deste modo permite avaliar a eficácia da Via Comum. A determinação do doseamento de fibrinogénio é feita através do Método de Clauss. Consiste na adição trombina em excesso ao plasma citratado diluído, isto é, elevadas concentrações de trombina e baixa concentração de fibrinogénio. Portanto, o tempo de coagulação é proporcional à concentração de fibrinogénio.

É um marcador útil na avaliação de doenças hepáticas, situações inflamatórias e patologias relacionadas com a coagulação.

D-Dímeros

O D-Dímero resulta da ação da plasmina sobre o coágulo de fibrina.

Apesar equipamento permitir a análise de D-Dímeros, no laboratório de estágio este parâmetro era realizado no mini VIDAS® Blue, por ELFA (Teste Imunoenzimático por Fluorescência).

Este parâmetro deve ser pedido em pacientes com sintomas ou histórico de doenças que causem formação inadequada de um coágulo, tais como Trombose Venosa Profunda (TVP), Tromboembolismo Pulmonar (TEP) ou Coagulação Intravascular Disseminada (CID) e para monitorizar a evolução e o tratamento destes pacientes.

Velocidade de Sedimentação Eritrocitária

A velocidade de sedimentação eritrocitária é a velocidade com que os eritrócitos sedimentam numa suspensão de plasma em condições controladas, isto é, na ausência de vibração e à temperatura ambiente, em 60 minutos. É um marcador de inflamação inespecífico, uma vez que a sua alteração pode verificar-se numa grande diversidade de patologias, varia também consoante a idade, o sexo, a raça e ainda na gravidez. Por isso, é apenas uma análise complementar, porque não se pode fazer um diagnóstico baseado apenas neste parâmetro. Contudo o seu aumento pode estar relacionado no caso da artrite reumatóide, doenças inflamatórias agudas e crónicas, mieloma múltiplo, hipertiroidismo, linfoma de Hodgkin. Pelo contrário há uma diminuição da velocidade de sedimentação em casos de insuficiência hepática e carcinomas.

Ves-Matic CUBE 30

Equipamento automatizado para determinar a velocidade de sedimentação eritrocitária em amostras de sangue total em tubos com anticoagulante EDTA, que por cada análise pode fazer um máximo de trinta amostras. O exame é executado em completa automação, desde a agitação à leitura, sem o contacto do sistema com a amostra, consumo da amostra, utilização de reagentes ou produção de resíduos. Este processamento demora 33 minutos e os resultados são impressos quando a análise termina, uma vez que o equipamento tem uma impressora incorporada.

Os resultados são comparáveis com os obtidos pelo método de Westergren modificado. O método de Westergren, método de referência, é executado manualmente sempre que o volume de amostra seja insuficiente para ser executado na técnica automática ou quando existe necessidade de confirmação de resultados elevados. Num tubo de sangue total com anticoagulante EDTA introduz-se um tubo de Westergren de 200 milímetros, preenchido até à marca zero e permanece em posição vertical durante uma hora e depois efetua-se a leitura.

Diariamente é realizado o controlo de qualidade interna (CQI) para averiguar a eficácia da leitura do sensor ótico e, por isso ter resultados com precisão e exatidão.

Eletroforese de Hemoglobinas

Como já foi dito, os glóbulos vermelhos têm na sua constituição uma proteína globular, a hemoglobina. A hemoglobina transporta o oxigênio através da corrente sanguínea e disponibiliza-o para todas as células. Trata-se de um tetrâmero constituído por dois pares de cadeias polipeptídicas, α , β , γ e/ou δ , ligadas por ligações não covalentes. Contudo, cada cadeia está ligada covalentemente a um grupo heme. Nos adultos, a hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$) constitui cerca de 97% do total da hemoglobina, a hemoglobina A₂ ($\alpha_2\delta_2$) representa 2-3% e a hemoglobina F (fetal, $\alpha_2\gamma_2$), que predomina na vida fetal, diminui ao longo do primeiro ano de vida e, no adulto tem um valor residual, menos de 1%.

A eletroforese da hemoglobina é um exame solicitado para medir e identificar os diferentes tipos de hemoglobina que se podem encontrar no sangue, para aconselhamento genético a casais que pretendam saber se os filhos poderão ter algum distúrbio no sangue relacionado com a síntese da hemoglobina e solicitado como exame de rotina para acompanhamento de pacientes já diagnosticados alterações na hemoglobina. Nesta análise é possível separar e medir as hemoglobinas normais das anormais através da técnica de HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Resolução).

Algumas pessoas possuem mutações genéticas, que originam alterações estruturais e funcionais relacionadas com a síntese de hemoglobina. Essas alterações podem originar hemoglobinopatias. Então, as hemoglobinopatias constituem um grupo de patologias de origem genética, em que as mutações nos genes que codificam a hemoglobina levam a alterações nesta produção. Estas alterações podem ser divididas em estruturais ou de síntese. Nas hemoglobinopatias estruturais ocorre a alteração em uma ou mais cadeias da hemoglobina, sendo que a mais frequente deste tipo é a anemia falciforme. Nas hemoglobinas por deficiência de síntese, isto é, diminuição da sua produção ocorre uma supressão parcial ou total da síntese de um ou mais tipos de cadeias polipeptídicas da globina. Aqui as hemoglobinopatias mais comuns são as talassémias, do tipo alfa e do tipo beta. Depois do diagnóstico destas patologias é essencial para um tratamento adequado, para não se agravar e constituir uma ameaça à vida dos pacientes. Para confirmar o diagnóstico são pedidos outros parâmetros como a dosagem do ferro, ferritina, transferrina e hemograma completo.

Hemoglobina Glicada

Denomina-se hemoglobina glicada à fração da hemoglobina que se liga à glicose, portanto esta análise mede a quantidade de glicose no sangue. Quanto maior for a glicose em circulação, maior serão os níveis da hemoglobina glicada.

Trata-se de uma análise, que não precisa de ser feita em jejum, importante tanto para o controlo e/ou diagnóstico como para o acompanhamento de um paciente diabético, uma vez que reflete os níveis glicémicos nos últimos 2-3 meses. No entanto, a Diabetes *Mellitus* pode permanecer assintomática durante algum tempo, então mesmo que sem sintomas, esta análise pode fazer parte de um *check-up*. Também pode ser pedida pelo clínico para fazer o diagnóstico de baixas contagens da hemoglobina e, possíveis anemias.

HA-8160 HbA1c

Analisador automatizado, que utiliza a metodologia de HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Resolução). Permite a análise de parâmetros como: hemoglobina glicada (HbA1c) e eletroforese de hemoglobinas (HbF, HbS, entre outras).

Caso Clínico

Um rapaz de 14 anos deu entrada nas urgências e foram prescritas análises consideradas urgentes, tais como o hemograma e parâmetros de bioquímica, serologia, imunologia e virologia.

Como se pode verificar através do boletim de análises clínicas (Figura 8), o hemograma apresentou uma inversão de fórmula entre os Linfócitos e Neutrófilos e o número de plaquetas relativamente baixo, ou seja, uma ligeira trombocitopenia em que não foram observados agregados.

HEMATOLOGIA			BIOQUIMICA		
HEMOGRAMA			BIOQUIMICA		
<i>Eritrograma</i>					
Eritrócitos	5.0 x10 ¹² /L	4.5 - 6.5	AST/TGO	178 U/L	7 - 26
Hemoglobina	14.1 g/dL	13.0 - 18.0	ALT/TGP	253 U/L	7 - 59
Hematócrito	41.4 %	41.0 - 54.0	SEROLOGIA		
V.G.M.	82.3 fL	76.0 - 101.0	PROT.C REACTIVA (QUANT)	10.1 mg/L	0.1 - 5.0
H.G.M.	28.0 pg	27.0 - 33.0	IMUNOLOGIA		
C.H.G.M.	34.1 g/dL	30.0 - 36.0	ATC ANTI V. CITOMEGÁLICO (IgG)		
RDW	14.0 %		Anticorpos IgG	9.1 UA/mL	
<i>Leucograma</i>			ATC ANTI V. CITOMEGÁLICO (IgM)		
Leucócitos	19.7 x10 ⁹ /L	4.0 - 10.0	Anticorpos IgM	Negativo	
Gran. Neutrófilos	19.0 % 3.7 x10 ⁹ /L	40.0 - 80.0	VIROLOGIA		
Gran. Eosinófilos	0.0 % 0.0 x10 ⁹ /L	1.0 - 6.0	ATC ANTI EPSTEIN-BARR		
Gran. Basófilos	0.0 % 0.0 x10 ⁹ /L	0.0 - 2.0	Anticorpos IgG	Negativo 0.02 UI/mL	
Linfócitos	79.0 % 15.6 x10 ⁹ /L	20.0 - 40.0	Anticorpos IgM	Positivo 0.71 (Índice)	
Monócitos	2.0 % 0.4 x10 ⁹ /L	2.0 - 10.0	Valores Referência:		
Morf.Leucocitária	O estudo do esfregaço do sangue periférico confirma ligeira leucocitose com linfocitose. Observaram-se frequentes linfócitos atípicos com grande pleomorfismo celular, muitos linfócitos grandes com citoplasma abundante e demonstrando basofilia citoplasmática generalizada ou limitada à periferia. Ligeira trombocitopenia (não foram observados agregados).				
PLAQUETAS	142 x10 ⁹ /L	150 - 450	Anticorpos IgG	Negativo <0.10	
			Duvidoso	0.10 - 0.21	
			Positivo	>0.21	
			Anticorpos IgM	Negativo <0.12	
			Duvidoso	0.12 - 0.19	
			Positivo	>0.19	

Figura 8 - Boletim de análises clínicas

Fonte da figura: Imagens retiradas durante o estágio laboratorial

Tendo sido feito o estudo do esfregaço sanguíneo periférico confirmou-se uma ligeira leucocitose com linfocitose (aumento do nº de linfócitos). Observaram-se frequentes linfócitos atípicos e reativos com grande pleomorfismo celular, muitos linfócitos grandes com citoplasma abundante e demonstrando basofilia citoplasmática generalizada ou limitada à periferia, representativos na Figura 9.

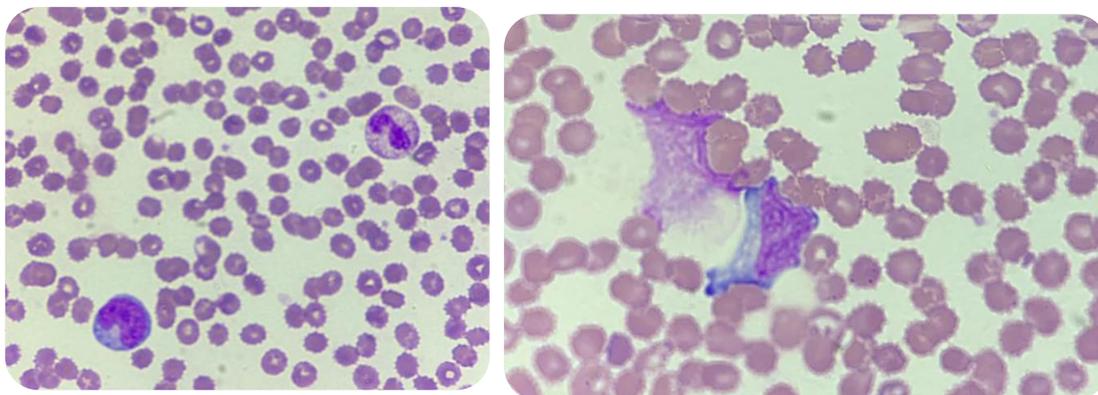


Figura 9 – Imagem microscópica do esfregaço sanguíneo
Fonte da figura: Imagens retiradas durante o estágio laboratorial

Relativamente aos parâmetros da bioquímica apresentou-se uma alteração das enzimas hepáticas, as transaminases.

Fazendo uma avaliação a todos os parâmetros e ao seu conjunto é de se suspeitar que esteja presente uma situação de mononucleose, popularmente, a doença do beijo. A inversão da fórmula, alteração das transaminases que são muito típicos numa situação de mononucleose infecciosa. Para o diagnóstico definitivo é efetuada a pesquisa de anticorpos IgG (imunoglobulina G) e IgM (imunoglobulina M) dirigidos aos EBV. Através do monoteste é feita a pesquisa de anticorpos IgM, que indica uma infeção recente e quando positivo é possível diagnosticar a doença.

A mononucleose infecciosa é uma doença geralmente benigna e com uma breve duração causada pelo vírus Epstein-Barr (EBV), que é transmitida através da saliva, gotículas nasais, espirros e tosses de terceiros, partilha de escovas de dentes, copos, garrafas de água, talheres. Em crianças através de troca de chupetas, lápis, brinquedos, entre outros na boca. Por isso é vulgarmente conhecida como “doença do beijo”. Afeta sobretudo crianças e jovens, dos 15 aos 25 anos de idade, altura em que é mais sintomática. Contudo, a grande maioria não apresenta sintomatologia sendo que apenas uma pequena percentagem da população, cerca de 5%, acaba por desenvolver sintomas. As restantes criam anticorpos ao vírus, ganhando resistência a possíveis infeções no futuro. A partir dos 30 anos considera-se uma situação rara.

Setor da Microbiologia Clínica

Durante a minha passagem neste setor, que foi o que mais me entusiasmou por ser o mais manual, integrei a rotina do laboratório, desde a receção e triagem das amostras até ao seu manuseamento. Acompanhei a leitura e interpretação das placas onde ocorreu o crescimento bacteriano, consoante a morfologia e meio escolhido, a valorizar dependendo do número de estirpes de bactérias presentes e da respetiva quantidade direcionando para a identificação do microrganismo e realização do antibiograma. Efetuei colorações de Gram, de Wright e de Ziehl-Neelsen, que pude observar ao microscópio ótico, assim como a visualização de alguns sedimentos urinários.

A Microbiologia Clínica engloba as áreas de Bacteriologia, Parasitologia, Micologia, Micobacteriologia e Virologia realizando-se pesquisas de microrganismos permitindo o diagnóstico e identificação microbiana e testes de suscetibilidade a antimicrobianos (TSA).

De todos os setores do laboratório este é o menos automatizado, por isso é o que exige maior trabalho técnico. Desta forma, o risco de contaminação é muito grande e deverá ser colmatado com boas práticas laboratoriais para não pôr em causa o trabalho efetuado e a segurança do pessoal técnico.

A obtenção de um diagnóstico apropriado e fiável está dependente de inúmeros fatores, desde logo a seleção apropriada da amostra a colher. Após uma colheita adequada da amostra, com o respetivo volume para evitar falsos resultados, esta deverá ser colocada num recipiente estéril, devidamente identificado e vedado, que promova a sua conservação. É fulcral minimizar os efeitos de espera entre a colheita e o processamento da amostra usando meios de transporte, conservantes, efetuar o transporte das amostras o mais rápido possível e num sistema de transporte apropriado. Assim que chegam ao laboratório, na Sala de Triagem é verificada a viabilidade de cada uma das amostras e se estiverem aptas a processar são triadas e processadas o mais breve possível para que estas não se tornem inviáveis e, consequentemente originem falsos resultados. Há amostras em que a colheita pode ser feita pelo próprio paciente, aí o técnico deve reconhecer uma amostra bem colhida e saber rejeitar as que não estão nas devidas condições para serem analisadas.

Um dos objetivos da Microbiologia Clínica é a identificação de microrganismos, que poderão estar a causar doenças ao indivíduo e administrar a respetiva terapêutica. Para isso é necessário efetuar um exame bacteriológico aos produtos biológicos rececionados.

A célula bacteriana

As bactérias são procaríotas que pertencem ao domínio *Bacteria*. São identificadas e classificadas em função de um conjunto de características relacionadas com a sua forma e organização celular, comportamento metabólico face a diferentes substratos, sequência de ADN (ácido desoxirribonucleico) genómico e reatividade a anticorpos dirigidos contra os antígenos parietais, flagelares e capsulares. (Barroso, Meliço-Silvestre e Taveira, 2014)

As bactérias podem apresentar uma grande variedade de tamanhos, formas e agrupamentos. Em relação ao tamanho podem ser tão pequenas como o maior vírus, como é o caso de *Veillonella*, que tem diâmetro de 0,3-0,5 µm (micrómetro), ou ser tão grande que são visíveis a olho nu, como *Epulopiscium fishelsoni* com comprimento de 600 µm e diâmetro de 80 µm. As formas mais frequentes das bactérias são os cocos e os bacilos. Contudo, podem existir cocobacilos (pequenos bacilos de dimensão semelhante a cocos, por ex. *Haemophilus influenzae*), vibriões (bacilos curvos que podem formar espirais incompletas ou o que se assemelha a uma vírgula, por ex. *Vibrio cholerae*), formas espiraladas ou helicoidais (por ex. *Treponema pallidum*) e formas filamentosas (por ex. *Streptomyces spp.*). As bactérias que não possuem uma forma característica podem assumir múltiplas formas são designadas pleomórficas (por ex. *Mycoplasma spp.* e *Corynebacterium spp.*). A forma depende em grande parte da parede celular, uma vez que quando esta é removida as bactérias ficam esféricas ou sem forma definida. As bactérias dividem-se por divisão binária e em algumas espécies agrupam-se de forma característica relacionados com os seus planos de divisão. A Figura 10 representa os tipos morfológicos e formas da associação das bactérias e exemplos de cada. (Barroso, Meliço-Silvestre e Taveira, 2014)

TIPOS MORFOLÓGICOS		EXEMPLOS
	Coco	<i>Staphylococcus</i>
	Bacilo	<i>Bacillus</i>
	Vibrião	<i>Vibrio</i>
	Espirilo	<i>Spirillum</i>
	Cocobacilo	<i>Brucella</i>
	Forma filamentosa	<i>Actinomyces</i>

MORFOLOGIA DE ASSOCIAÇÃO		EXEMPLOS
	Diplococo	<i>Neisseria</i>
	Cocos em cadeia	<i>Streptococcus</i>
	Cocos em téttrade	<i>Sporosarcina ureae</i>
	Cocos em cacho	<i>Staphylococcus</i>

Figura 10 - Tipos morfológicos e formas de associação das bactérias e exemplos de cada.
Fonte da figura: BARROSO, Helena; MELIÇO-SILVESTRE, António; TAVEIRA, Nuno - **Microbiologia Médica I**. Lisboa : LIDEL - Edições Técnicas, Lda, 2014. ISBN 978-989-752-057-0.

Identificação bacteriana

Como já foi referido, logo que uma amostra chega ao laboratório verifica-se se está em condições de ser analisada e, se for o caso, é sujeita a um exame macroscópico onde se observa e regista o aspeto da mesma, como por exemplo a cor da urina, turvação de fluídos, o volume, forma das fezes, aspeto da expetoração, entre outros.

Posto isto, inicia-se o exame microscópico, que determina a qualidade da amostra, ajuda no diagnóstico da doença infecciosa e na interpretação de culturas através da avaliação da observação microscópica de bactérias, com o intuito de avaliar a morfologia, tamanho e tipo de agrupamento e, ainda dita a necessidade de processos não rotineiros. O exame microscópico é composto pelo exame direto (preparações a fresco e preparações coradas, como a Coloração de Gram, Coloração de Wright e Coloração de Ziehl-Neelsen) e o exame cultural.

A coloração das bactérias torna-se necessária, uma vez que a maioria das bactérias são transparentes e difíceis de observar ao microscópio em campo claro, em virtude do seu protoplasma ser pouco refringente. Por isso, ao serem coradas é possível distinguir e identificar características celulares. A coloração de Gram é o método de coloração mais importante em bacteriologia tratando-se de uma coloração diferencial, ou seja, usa dois corantes que permite distinguir dois grandes grupos de bactérias com base na retenção desses corantes: Gram-positivo e Gram-negativo. Quando aplicada ao material clínico recolhido num paciente pode proporcionar informação valiosa sobre a(s) bactéria(s) que causa(m) determinada doença. A reatividade ao Gram ajuda também a dirigir e seleccionar os testes necessários à identificação das bactérias. (Barroso, Meliço-Silvestre e Taveira, 2014)

O primeiro corante – Violeta de Genciana – é aplicado sobre o esfregaço bacteriano corando todas as células de roxo. De seguida cobre-se o esfregaço com o mordente – Soluta de Lugol – que aumenta a afinidade do corante para a bactéria e torna a coloração mais rápida e estável. Ainda com as células coradas de roxo, aplica-se o diferenciador – Álcool-Acetona – descora algumas células, enquanto outras permanecem roxas. Este fenómeno ocorre devido a diferenças na estrutura da parede

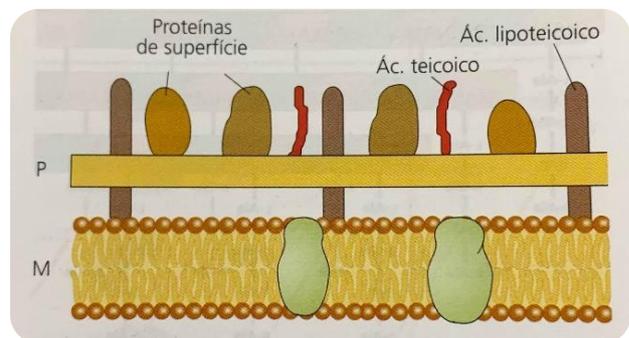


Figura II - Parede celular de bactérias Gram-positivo.

M - Membrana citoplasmática; P - peptidoglicano

Fonte da figura: BARROSO, Helena; MELIÇO-SILVESTRE, António; TAVEIRA, Nuno - **Microbiologia Médica I**. Lisboa : LIDEL - Edições Técnicas, Lda, 2014. ISBN 978-989-752-057-0.

celular, isto é, a presença da grande camada de peptidoglicano e de ácido tecóico na parede celular das bactérias Gram positivas (Figura 11) impedem a saída do corante primário. Portanto, é este o fator predominante no resultado da coloração de Gram. Por fim, adiciona-se o corante secundário – Fucsina de Ziehl Diluída ou Safranina – que cora as bactérias descoloradas por ação do diferenciador, corando-as de rosa, uma vez que a parede celular destas bactérias contém uma camada fina de peptidoglicano e uma membrana externa constituída por lipopolissacárido (LPS), proteínas, fosfolípidos, lipoproteínas, como representa a Figura 12. A membrana externa é uma barreira protetora que previne ou regula a entrada nas bactérias Gram-negativo de sais biliares, antibióticos e outras substâncias

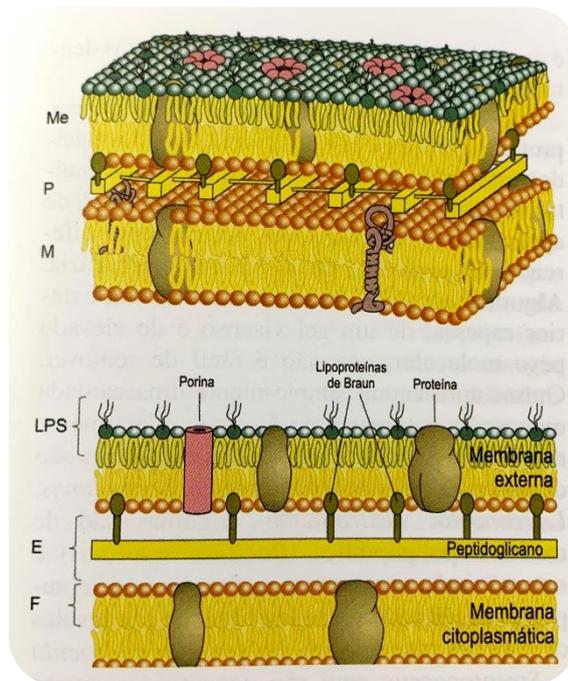


Figura 12 - Parede celular de bactérias Gram-negativo.

M - Membrana citoplasmática; P – peptidoglicano; Me – Membrana externa; LPS – lipopolissacárido; E – espaço periplasmático; F - fosfolípidos

Fonte da figura: BARROSO, Helena; MELIÇO-SILVESTRE, António; TAVEIRA, Nuno - **Microbiologia Médica I**. Lisboa : LIDEL - Edições Técnicas, Lda, 2014. ISBN 978-989-752-057-0.

tóxicas para a bactéria devido à elevada hidrofobicidade da membrana externa. Contudo, os antibióticos com baixo peso molecular atravessam a membrana externa através dos canais de porinas. Assim, as bactérias que retêm o corante primário, isto é, coram de roxo designam-se por bactérias Gram positivo e as que retêm o corante secundário e coram de rosa designam-se por bactérias Gram negativo. O tempo de descoloração é fundamental na diferenciação das bactérias Gram positivas das bactérias Gram negativas, uma vez que a exposição prolongada do diferenciador pode acabar por remover o corante primário e uma exposição insuficiente pode não retirar todo o corante primário das bactérias Gram negativo.

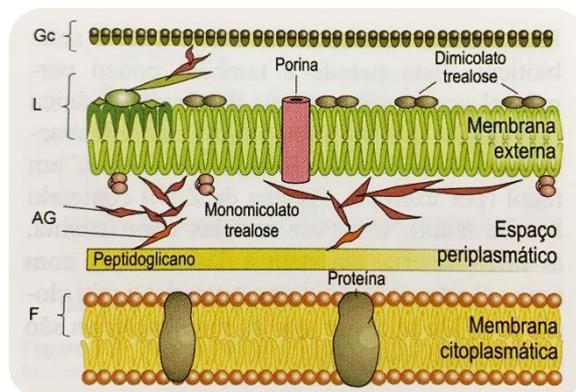


Figura 13 - Parede celular de micobactérias.

Gc – glicano capsular; L – lipoarabinomanano; AG - arabinogalactano

Fonte da figura: BARROSO, Helena; MELIÇO-SILVESTRE, António; TAVEIRA, Nuno - **Microbiologia Médica I**. Lisboa : LIDEL - Edições Técnicas, Lda, 2014. ISBN 978-989-752-057-0.

A coloração de Ziehl-Neelsen é uma coloração diferencial útil na identificação de micobactérias ou alguns parasitas como o

Cryptosporidium. As micobactérias têm a parede celular (Figura 13) extraordinariamente espessa e complexa, fundamentalmente constituída por peptidoglicano, ligado a arabinogalactano (AG), por sua vez ligados a ácidos micólicos (lípidos complexos, ramificados, com cadeias longas). Forma-se assim o complexo peptidoglicano – micoarabinogalactano. O elevado teor de lípidos tornam a membrana das micobactérias muito hidrofóbica e pouco permeável, o que lhes confere uma resistência natural a muitos antibióticos e à descoloração do diferenciador Álcool e Ácido Sulfúrico a 25%. Portanto, a única maneira de corar o protoplasma das micobactérias é usando uma solução de fucsina em fenol. Uma vez coradas com fucsina, as micobactérias resistem à descoloração e, então diz-se que são bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR). Esta característica própria destes microrganismos fazem com que esta coloração seja um método rápido no diagnóstico presuntivo da infecção a micobactérias. Geralmente esta coloração é feita a pedido do médico.

O exame direto é um método simples e económico que permite fazer uma identificação presuntiva. Apenas em casos excepcionais pode estabelecer-se a identidade de um microrganismo através das características morfológicas. Portanto, é essencial o exame cultural, uma vez que a maioria dos produtos biológicos contêm misturas de bactérias. Ao fazerem-se culturas destes produtos desenvolvem-se bactérias de espécies diferentes – cultura mista. Para se identificar cada uma dessas bactérias diferentes é preciso cultivar o produto de forma a que as colónias surjam separadas e sejam constituídas por um único tipo de bactérias – colónia pura. Através de uma colónia pura obtém-se uma cultura pura, que permite a sua identificação. Assim, o isolamento bacteriano corresponde a um conjunto de manipulações que têm como finalidade obter culturas puras, sendo necessário dispor de meios de cultura. Os meios de cultura podem ser líquidos e sólidos e a nível de composição consideramos os seguintes tipos de meios: meios enriquecidos, meios seletivos (contêm antibióticos ou químicos que inibem o crescimento de algumas espécies de bactérias), meios eletivos (favorecem o crescimento de um grupo de bactérias, durante algum tempo, em detrimento de outro) e meios de diagnóstico ou diferenciais (detetam características bioquímicas importantes numa identificação preliminar).

O meio de cultura para a inoculação dos produtos biológicos deve ser escolhido tendo em conta a origem da amostra e os agentes patogénicos mais frequentes desses locais. Na Tabela VIII encontram-se os meios de cultura que o laboratório de estágio dispõe e a respetiva descrição de cada um.

Tabela VIII – Meios de cultura do Laboratório de Estágio

Meios de Cultura	
Gelose Chapman 2 (MSA 2)	Meio de isolamento seletivo para as bactérias do género <i>Staphylococcus</i> .
Gelose MacConkey (MCK)	Gelose seletiva para o isolamento de alguns bacilos Gram negativos, enterobactérias e <i>Escherichia coli</i> .
Gelose de chocolate Haemophilus 2 (HAE2)	Meio de isolamento seletivo de <i>Haemophilus spp.</i>
Meio Lowenstein-Jensen (LJ-T)	Meio que favorece o crescimento de micobactérias.
Gelose Chocolate PolyViteX™ VCAT3 (VCA3)	Meio de isolamento seletivo de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Neisseria meningitidis</i> .
Caldo Selenito F (SELENITO F-T)	Este meio destina-se ao enriquecimento da <i>Salmonella</i> , a partir das fezes.
Gelose Chocolate PolyViteX (PVX)	Meio de isolamento para o crescimento de estirpes exigentes pertencentes aos géneros <i>Neisseria</i> e <i>Haemophilus</i> e <i>Streptococcus pneumoniae</i> .
Gelose chromID™ Candida (CAN2)	Meio de isolamento seletivo de leveduras, identificação da espécie <i>Candida albicans</i> e diferenciação presuntiva de um conjunto de espécies que agrupa <i>C. tropicalis</i> , <i>C. lusitaniae</i> e <i>C. kefyr</i> .
Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS)	Meio de isolamento que se destina a facilitar o crescimento de microrganismos exigentes, como <i>Streptococcus spp.</i> e <i>Listeria</i> e avaliar o tipo de hemólise.
Gelose chromID® CPS® Elite (CPSE e CPSO)	Meio de isolamento, contagem e identificação bacteriana na urina e permite a contagem microbiana de bactérias através de métodos de inoculação padronizados, identificação direta de <i>Escherichia coli</i> e a identificação presuntiva das seguintes espécies bacterianas: <i>Enterococcus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Proteus</i> , <i>Providencia</i> e <i>Morganella</i> .
Gelose Hektoen (HEKT)	Meio seletivo de isolamento e diferenciação para a deteção das espécies de <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i> .
Gelose Campyloset (CAM)	Meio seletivo para o isolamento de <i>Campylobacter</i> intestinal (<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> principalmente). A presença de sangue de carneiro na sua composição favorece o crescimento da espécie alvo.
Gelose chromID™ Strepto B (STRB)	Meio cromogénico seletivo utilizado para a deteção de <i>Streptococcus agalactiae</i> em mulheres grávidas e em recém-nascidos a partir de amostras de origem clínica.
Gelose Dermatofitos (DERMATO-T)	Meio seletivo que permite a cultura dos dermatofitos a partir de colheitas polimicrobianas.
Gelose Columbia ANC + 5% de sangue de carneiro (CNA)	Meio de isolamento seletivo que permite o desenvolvimento das bactérias Gram positivas e avaliação do tipo de hemólise.
Caldo Todd Hewitt + Antibióticos (TODD H-T)	Caldo de enriquecimento seletivo destinado à deteção dos estreptococos do grupo B na mulher grávida. Também pode ser utilizado para o enriquecimento dos <i>S. aureus</i> no âmbito do rastreio dos <i>S. aureus</i> resistentes à metilicina (MRSA).
Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol (SGC2)	Meio seletivo para o isolamento de leveduras e bolores.

Fonte: Adaptação de Orientações para elaboração de um manual de boas práticas em Bacteriologia (Fonseca et al., 2004)

Após a inoculação da amostra no(s) meio(s) de cultura selecionados são selecionadas condições de incubação, como a temperatura, o tempo, a humidade e a atmosfera necessária para o crescimento dos microrganismos.

Ao fim do tempo de incubação necessário os meios de cultura são retirados da estufa e se não se observar crescimento bacteriano dá-se o exame cultural como negativo, não havendo mais procedimentos a cumprir. No caso de se observar crescimento bacteriano, procede-se à observação das colónias, isto é, à observação da forma, elevação, margem, superfície, cor, opacidade, cheiro, mudança dos meios de cultura, contagem de colónias, entre outros. Além das características culturais existem métodos bioquímicos (Tabela IX), que evidenciam características bioquímicas, que fornecem informações preliminares, e desta forma ajudam na identificação bacteriana, assim como no auxílio da escolha de cartas de identificação e de suscetibilidade aos antimicrobianos no equipamento automatizado Vitek® 2. (Fonseca et al., 2004)

Tabela IX - Métodos bioquímicos que auxiliam na identificação bacteriana

Teste da Coagulase	Distingue <i>Staphylococcus aureus</i> (coagulase positiva) de outros <i>Staphylococcus spp</i> (coagulase negativa). Adiciona-se plasma de coelho às bactérias em estudo. Resultados obtidos após 4 horas, a 37°C de incubação. Se houver formação de coágulo é coagulase positiva. No laboratório de estágio usa-se um teste de aglutinação designado Pastorex™ Staph-plus, que permite uma deteção mais rápida do <i>S. aureus</i> . Este teste é constituído por latex sensibilizado por IgG (imunoglobulina G) e fibrinogénio, que detetam o fator de afinidade por proteína A e fibrinogénio, característicos desta bactéria.
Teste da Oxidase	Permite a deteção da enzima citocromo oxidase das bactérias. Esta enzima é característica do género <i>Neisseria</i> e da maioria das espécies de <i>Pseudomonas</i> , ambos oxidase positiva. Permite diferenciar de outros cocos negativos da família das enterobactérias, uma vez que é oxidase negativa. Na presença de oxigénio na atmosfera e de citocromo C, esta enzima oxida o reagente fenilenodiamina, para formar um composto violeta, o indofenol – oxidase positiva em 10-60 segundos. Citocromo c reduzido → Citocromo c oxidado
Teste da Catalase	Diferencia <i>Staphylococcus spp</i> (catalase positiva) de <i>Streptococcus spp</i> (catalase negativa). Adicionar gotas de peróxido de hidrogénio (H ₂ O ₂) a uma colónia bacteriana e observar se há ou não libertação de oxigénio (O ₂). H ₂ O ₂ → H ₂ O + O ₂ Na catalase positiva há libertação de oxigénio (O ₂) na forma de pequenas bolhinhas.
Teste com optoquina	A espécie <i>Streptococcus pneumoniae</i> é geralmente sensível à optoquina (aparecimento de halo de inibição), o que o distingue dos outros estreptococos α-hemolíticos.
Teste do indol e TDA	Deteção da produção de indol, bem como a presença de um triptofano desaminase (TDA) nas enterobactérias. A partir de colónias isoladas na gelose chromID™ CPS®, contendo triptofano, as bactérias que possuem uma triptofanase degradam o triptofano libertando indol. Esta reação é revelada pelo aparecimento de uma coloração rosa choque, como é o caso da <i>Escherichia coli</i> . A partir de culturas em meios que contêm triptofano, as bactérias que possuem uma triptofano desaminase degradam o triptofano libertando ácido indol-pirúvico. Esta reação é revelada pelo aparecimento de uma coloração acastanhada, ou seja, TDA positivo como é o caso do <i>Proteus mirabilis</i> .

Fonte: Adaptação de Orientações para elaboração de um manual de boas práticas em Bacteriologia (Fonseca et al., 2004)

Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos

O passo seguinte é a identificação bacteriana e a realização dos respetivos testes de suscetibilidade a antimicrobianos (TSA).

A atividade antimicrobiana é medida *in vitro* para se determinar a sensibilidade de um determinado microrganismo a concentrações conhecidas do fármaco. Entre os vários fatores que afetam a atividade antimicrobiana é preciso considerar o pH do ambiente, composição do meio, estabilidade do antimicrobiano, concentração do inóculo (quanto maior o inóculo bacteriano, menor a sensibilidade aparente dos microrganismos, sendo que a inibição de grandes populações é menos rápida e completa do que em populações mais pequenas), tempo de incubação e atividade metabólica dos microrganismos, uma vez que influenciam significativamente os resultados dos testes. Estes testes são executados em bactérias isoladas de amostras clínicas e consideradas responsáveis pela infeção e/ou suscetibilidade do agente patogénico desconhecida.

Quando se conhece o agente etiológico responsável por uma infeção bacteriana, por vezes é necessário recorrer a testes de suscetibilidade a antimicrobianos para avaliar a capacidade de um antimicrobiano inibir ou não o crescimento de um microrganismo, permitindo uma escolha mais eficaz da terapêutica a administrar no doente. Para além da suscetibilidade é importante ter em conta outros fatores na escolha do agente antimicrobiano tais como: toxicidade seletiva, espetro de atividade, efeitos adversos, o local de infeção, duração do tratamento e interação com outros agentes antimicrobianos. (Brooks *et al.*, 2014)

A avaliação da suscetibilidade antimicrobiana é determinada quantitativamente através da concentração mínima inibitória (CMI) e qualitativamente dando a bactéria em causa como resistente (R) quando o antibiótico é ineficaz, intermédia (I) quando o antibiótico pode ser ativo em doses elevadas ou quando a localização da infeção permite obter grandes concentrações a nível do foco infeccioso, ou suscetível (S) quando o antibiótico é eficaz, de acordo com as normas EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) e pode ser efetuada por dois métodos principais: teste manual de difusão em disco (Técnica de Kirby-Bauer) e através do equipamento automatizado, Vitek® 2. (Farmacêutica, [s.d.]

O teste de difusão em disco – Técnica de Kirby-Bauer – consiste na preparação do inóculo com uma turvação equivalente a 0,5 McFarland. Inoculação da gelose de Mueller-Hinton pela técnica de Sementeira em Toalha. Colocação dos discos de papel de filtro que contém uma determinada concentração de fármaco sobre a superfície do meio. Incubação a 37°C 18 a 24 horas. Após a incubação mede-se o diâmetro da zona de inibição, em milímetros, à volta do disco e comparam-se os valores obtidos com as tabelas publicadas pela EUCAST. É

um método simples, barato e rápido contudo, está sujeito a fatores que influenciam os resultados como a densidade do inóculo incorreta, a composição do meio de cultura, a espessura de gelose, a temperatura e o tempo de incubação (35-37°C durante 18 horas), características do crescimento das estirpes, o tempo de aplicação do disco contendo o agente e a conservação dos discos. (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2014)

Com o equipamento Vitek[®] 2 além de fazer identificação bacteriana, faz também a suscetibilidade aos antimicrobianos de diferentes microrganismos. Para isso são feitas suspensões bacterianas, a partir de culturas puras, em solução salina com inóculo de 0,5 a 0,65 da escala de McFarland. A escolha adequada das cartas de identificação e sensibilidade aos antimicrobianos é fulcral para se obter bons resultados. As cartas contêm poços impregnados com antibióticos onde são determinadas as concentrações mínimas inibitórias dos vários agentes antimicrobianos e, como foi referido anteriormente, os resultados obtidos são interpretados de acordo com as normas EUCAST.

Amostras biológicas

Todas as amostras devem ser colhidas antes de iniciada qualquer terapêutica antibiótica, para que não se verifique inibição do crescimento do agente patogénico. A colheita deve ser efetuada em condições de esterilidade, de modo a que o produto biológico não seja contaminado, pelo que se torna necessária a utilização de instrumentos de colheita estéreis e deve-se proceder sempre à descontaminação da superfície corporal. (Barroso, Meliço-Silvestre e Taveira, 2014)

A amostra biológica deve ser representativa do processo infeccioso e a quantidade deve ser adequada. (Brooks *et al.*, 2014) Durante o transporte, a amostra deve ser conservada o mais possível no seu estado original e sem deterioração significativa, mantendo a viabilidade dos microrganismos.

As amostras biológicas recebidas com maior frequência são a urina as fezes. Com menor frequência inclui-se o sangue, os exsudatos (vaginal, uretral, nasal), as secreções brônquicas, lavados brônquicos e broncoalveolares, feridas (abcesso, pus) e cateteres.

Urina

As infeções do trato urinário são das mais comuns, encontrando-se em todos os grupos etários. Contudo ocorre com maior incidência em mulheres jovens do que nos homens, porque estes possuem uma urina mais inibidora devido aos fluidos prostáticos e a

sua anatomia do trato urinário também ajuda, uma vez que a uretra é maior nos homens do que nas mulheres, para além do pH e osmolaridade.

Os sintomas mais frequentes da infeção do trato urinário são a urgência e frequência das micções, às quais se associa mal-estar ou dor. A infeção mais comum é a cistite, devida a infeção da bexiga por uma bactéria uropatogénica, que é na maioria dos casos *Escherichia coli*, mas também, por vezes, *Staphylococcus saprophyticus* ou, especialmente nas infeções hospitalares, *Klebsiella pneumoniae*, var. *aerogenes* ou *oxytoca*, *Proteus mirabilis*, outros bacilos coliformes, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Streptococcus faecalis*. Pode ocorrer infeção por cândidas nos indivíduos diabéticos ou imunodeficientes.

Como infeções bacterianas mais graves são a pielite e a pielonefrite, cujos sintomas incluem, habitualmente dor na região lombar e febre, acompanhada ou não de bacteriemia, detetada por hemocultura. O respetivo agente causal pode ser qualquer dos que provocam a cistite, mas ocorrem alguns casos devido a *Staphylococcus aureus*. (Colle et al., 1993)

A colheita da amostra pode ser feita pelo doente de modo a evitar que os microrganismos que colonizam a uretra contaminem a amostra. Para isso o laboratório deve explicar de forma clara como proceder, através da primeira urina da manhã porque é a mais concentrada, rejeitando a primeira porção da micção e recolher para o contentor estéril o jato intermédio da urina e descartar o restante. Depois cabe a cada laboratório definir critérios de aceitação/rejeição de amostras. É importante evitar a contaminação com a microbiota normal da vagina, perianal e uretral. A colheita pode ser feita em crianças de fralda através de um saco coletor de urina ou recorrendo a cateter urinário ou aspiração por punção suprapúbica, colheitas estas executadas por pessoal especializado.

Após a colheita procede-se ao transporte sem demora, uma vez que esta amostra constitui um excelente meio de cultura e as bactérias contaminantes podem multiplicar-se até atingirem um número significativo. Se for inevitável a demora a amostra deve ser refrigerada e processada nas duas horas seguintes.

A urocultura é uma análise da urina consta de quantificação dos microrganismos presentes na amostra e na urina tipo II ou sumária da urina, na qual é feita a avaliação química e citológica da urina.

O processamento inicia-se na quantificação dos microrganismos presentes na amostra, porque a amostra tem de ser usada sem centrifugar e nesta fase há menos riscos de contaminação. No laboratório de estágio era usada a gelose chromID® CPS® Elite (CPSE e CPSO), que consiste num meio de isolamento, contagem microbiana de bactérias através de métodos de inoculação padronizados e identificação direta de *Escherichia coli* ou a identificação

presuntiva de organismos infecciosos no trato urinário, como por exemplo *Proteus*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, entre outros. Uma vez que a gelose é constituída por uma base muito rica de diferentes peptonas e substratos cromogéneos que permite a deteção da atividade enzimática específica. Após homogeneização, o meio é inoculado diretamente com urina através de uma ansa plástica calibrada de 1 µL (microlitro), dado que cada placa é dividida ao meio e dá para duas amostras (por vezes utiliza-se a placa inteira, mas com inoculação de 10 µL de amostra), imergindo-a na urina e segurando-a na vertical. Traçar o raio da placa para distribuir a urina na ansa e a seguir, sem adicionar mais urina, fazer traços perpendiculares à estria, juntos por toda a superfície da meia placa. Depois de identificada incubar a placa invertida a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, em aerobiose, durante 18 a 24 horas. Após a incubação existe uma análise quantitativa onde se faz uma contagem semi-quantitativa, em que para a cultura ser positiva terá de ter um número superior a 100 colónias, isto é $>10^5$ CFU/mL (unidades formadoras de colónias por mililitros). Normalmente, se houver número inferior de colónias, não se valoriza e dá-se como urocultura negativa e o procedimento termina. Também não se valoriza quando se observam três ou mais espécies de bactérias dando a urocultura como polimicrobiana, a valorizar pela clínica. A urucultura é positiva e a valorizar quando: é $>10^5$ CFU/mL com cultura pura, presença de leucocitúria com quadro clínico; é $>10^3$ CFU/mL e $<10^5$ CFU/mL, mas há leucocitúria e sintomas com certos tipos de bactérias presentes (ex: *Escherichia coli* e *Stahylococcus saprophyticus*); em qualquer punção com ≥ 10 colónias; quando é $>10^5$ CFU/mL e há duas espécies, em que uma delas está claramente em maioria e apresenta colónias isoladas num doente com leucocitúria e quadro clínico compatível com infeção urinária. Existem outras situações cuja avaliação é feita caso a caso de acordo com o tipo de doente em causa.

Na sumária da urina ou urina tipo II avaliam-se alguns parâmetros bioquímicos (glicose, pH, bilirrubina, presença de sangue, proteínas, leucócitos, entre outros). Após essa análise feita no equipamento Aution Max Ax-4280, as amostras são centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos, são decantadas e procede-se à observação do sedimento urinário. Com o condensador em baixo, inicia-se com a objetiva de 10x para a visualização de cristais e depois passar à de 40x, onde se observam e quantificam os leucócitos, eritrócitos, células epiteliais e outros elementos figurados.

Para além da urocultura, as amostras de urina que chegam ao laboratório poderão ser direcionadas para o Setor de Bioquímica se tiverem parâmetros de Bioquímica a determinar. No Setor de Microbiologia ainda é possível usar as amostras das urinas para realizar testes de gravidez através de um teste rápido com base no método de imunocromatografia concebido

para a deteção qualitativa da hormona gonadotrofina coriónica humana (BhCG). Após cinco minutos obtém-se o resultado, que é positivo ou negativo.

No caso de uroculturas positivas elabora-se o antibiograma respetivo, pelo sistema Vitek® 2. Todas as amostras, assim como culturas devem ser guardadas por mais 48 a 72 horas após a saída dos resultados, tempos estes controlados pelo sistema informático.

Fezes

O trato gastrointestinal apresenta defesas contra os invasores, tais como o suco gástrico do estômago, motilidade do intestino delgado, entre outros, contudo, nem sempre essas defesas são suficientes e ocorrem infeções gastrointestinais. Devem ser feitas perguntas – história detalhada da ingestão de alimentos nos últimos três dias, histórico de sintomas gastrointestinais prévios, viagens recentes, toma de medicação, entre outros - ao doente para que seja possível chegar, ao microrganismo patogénico, em que os mais frequentes são *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia spp.*, *E. coli*, *Campylobacter spp.* e microrganismos parasitológicos como *Giardia lamblia*.

As amostras mais analisadas para o diagnóstico das infeções gastrointestinais são as fezes dos doentes com ou sem dores abdominais, diarreia e/ou vómitos. (Colle *et al.*, 1993)

Após a colheita da amostra para um recipiente estéril, deve ser enviada para o laboratório, o mais rápido possível, evitando a refrigeração e conservantes e deve ser acompanhada com a requisição em que se pede um exame específico: coprocultura, parasitológico e/ou pesquisa de sangue oculto nas fezes.

O primeiro passo foi o exame macroscópico das fezes, verificando a sua consistência, se são fluidas ou moldadas, a presença de muco, pus e sangue indicativa de disenteria grave, bem como a presença de helmintas.

Na coprocultura faz-se a pesquisa de *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* inoculando a gelose de MacConkey e caldo seletivo de enriquecimento de Selenito a 37°C durante 18 a 24 horas. Após 24 horas de incubação repica-se do caldo de selenito para a gelose de Hektoen e fica a incubar por mais 24 horas a 37°C. No caso de haver crescimento e de serem colónias suspeitas continua-se o processo de identificação e de TSA.

Se for necessário a pesquisa de outros microrganismos o laboratório tem de ser informado para uma pesquisa mais orientada como no caso da pesquisa de *Campylobacter spp.* Neste caso as amostras são repicadas para a gelose de Campyloset a 42°C, durante 48 horas, em atmosfera microaerofílica (5% de oxigénio, 10% de dióxido de carbono e 85% de azoto),

para o *Campylobacter spp.* crescer. Se não houver crescimento bacteriano característico a cultura é dada como negativa.

As parasitoses intestinais são infecções do aparelho gastrointestinal causadas por parasitas. Embora estes organismos tenham diminuído nos últimos anos, devido à melhoria de condições sanitárias, continuam a ter um peso importante nos distúrbios gastrointestinais, sendo que as crianças, doentes com o sistema imunitário diminuído e viajantes que regressam de países com menor índice sanitário são os grupos mais afetados. O exame parasitológico trata-se de um teste de pesquisa de parasitas, que é simples e em que o indivíduo deve ter o cuidado, três dias antes da colheita, de evitar: substâncias gordas sobretudo óleos laxantes e supositórios, alimentos que deixem muitos resíduos, como frutas de cutículas resistentes (tomates, pêssegos), grãos de envelope duro (ervilhas, feijão, lentilhas), legumes secos, produtos opacos utilizados em exames radiológicos, em especial sais de bário, composições farmacêuticas com carvão vegetal, sais de magnésio, calcário, uma vez que vão alterar a cor das fezes. Devem ser feitas três colheitas em três dias consecutivos - os parasitas podem não ser expelidos todos os dias - sem misturar amostras, para um recipiente de boca larga e descartável e conservadas num recipiente hermético a 4°C. Antes do processamento da amostra deve fazer-se uma observação macroscópica e registar a consistência, cor, presença de muco e/ou sangue, que poderá auxiliar no diagnóstico. No laboratório de estágio, ao contrário do que acontecia na coprocultura, no exame parasitológico não são feitos esfregaços e usa-se um kit de concentração de ovos e parasitas fecais para o exame microscópico identificando ovos de helmintas, quistos e trofozoítos de protozoários e/ou vermes. Este exame parasitológico usa a técnica da concentração, através de métodos de flutuação e sedimentação, para aumentar o número de quistos, trofozoítos, ovos ou larvas, eliminar a maior parte do material orgânico fecal (resíduos) e apresentar os organismos num estado inalterado, de forma a serem facilmente identificados. Na observação microscópica, num primeiro tempo percorre-se metodicamente toda a superfície da lamela com objetiva de 10x e quando se observa algo suspeito passa-se para uma maior ampliação. No segundo tempo percorre-se toda a preparação com a objetiva de 40x. Em toda a observação ter em atenção a gorduras (cristais de ácidos gordos), açúcares (degradação do amido), proteínas (fibras de carnes), hemácias, leucócitos, células epiteliais intestinais.

Para a pesquisa de sangue oculto nas fezes são usados testes rápidos, não invasivos utilizados no rastreio do cancro colorretal, que se baseiam no método imunocromatográfico, para a deteção qualitativa de hemoglobina humana nas fezes, através de reações de anticorpos específicas, não requerendo dieta ao contrário

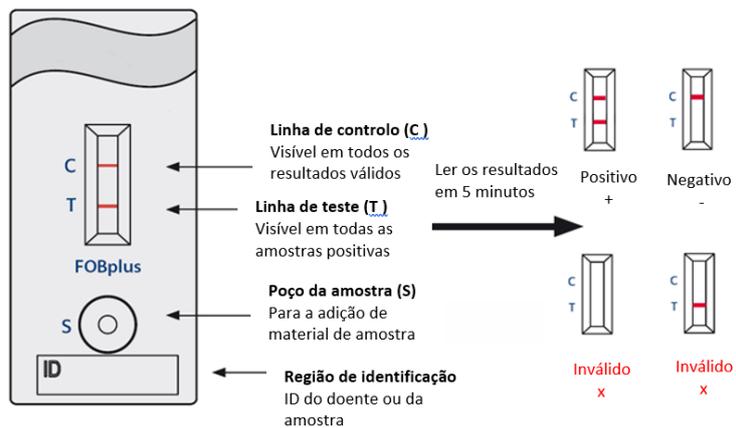


Figura I4 - Interpretação de resultados.

Origem da figura: <https://www.biomerieux.pt/produto/bionexiar-fobplus>

dos testes mais antigos, que não eram específicos para a hemoglobina humana. Ao fim de cinco minutos obtém-se o resultado. Tal como representa a Figura I4, se a amostra de fezes contiver hemoglobina, surgirá uma linha na região da linha de resultado de teste (T) indicando um resultado positivo. A hemoglobina presente na amostra de fezes reage com um anticorpo monoclonal específico marcado com ouro. Este complexo ouro-anticorpo-hemoglobina migra por ação capilar pela membrana e atinge a região da linha do teste (T), que se encontra pré-revestida com anticorpos anti-hemoglobina. O complexo ouro-anticorpo-hemoglobina é capturado pelos anticorpos imobilizados na membrana, resultando na formação de linhas vermelhas. Se a amostra de fezes não contiver hemoglobina, não surgirá nenhuma linha na região da linha de resultado de teste (T) indicando um resultado negativo. O teste só é válido se surgir uma linha na região da linha de controlo (C), que serve de controlo do procedimento e indica se a migração do teste foi efetuada corretamente. (bioMérieux, 2018)

Sangue - Hemocultura

Representa uma das mais importantes amostras em microbiologia clínica, pois põe em evidência microrganismos no sangue. Uma hemocultura é geralmente positiva ao fim de um a cinco dias e pode corresponder a três situações: septicémia, bacteriemia e contaminação. A deteção de uma septicemia ou bacteriemia indica que a vida do doente corre risco iminente e que há a maior urgência em obter resultados e estabelecer a terapêutica adequada. A contaminação (está presente uma bactéria não patogénica que contaminou acidentalmente a hemocultura, muitas vezes na altura da colheita) é a principal dificuldade que ocorre, na interpretação dos resultados, resulta da possibilidade de a amostra estar contaminada com microrganismos comensais ou contaminantes comuns da pele como o *Staphylococcus*

epidermidis. Porém, em doentes debilitados estes microrganismos comensais podem ter um papel patogénico importante e, por isso tem de se considerar cada caso. Para tal devem efetuar-se culturas de várias amostras, individuais, do sangue, uma vez que o isolamento da mesma espécie de microrganismo, a partir de amostras diferentes, sugere que ele se encontra, provavelmente, presente como causa de infeção e não como mero contaminante. (Colle et al., 1993)

Para minimizar as dificuldades de interpretação é imperativo evitar a contaminação, quer no momento da colheita, quer durante a análise laboratorial, respeitando as normas de assepsia. Assim, após a desinfeção da pele, sobre a veia, usar uma seringa estéril para a punção venosa. O técnico deve evitar contaminar-se a si próprio ou à parte exterior dos frascos de cultura com o sangue potencialmente infetante.



Figura 15 - Frascos de hemocultura

Fonte da figura:

<https://www.nursing.com.br/exame-hemocultura-o-que-e/>

Assim que a amostra chega ao laboratório é triada e os frascos são introduzidos no equipamento Bactec 9050™. Este equipamento com sistema automatizado deteta qualquer indício precoce de desenvolvimento bacteriano, através da fluorescência – muito sensível. Quando se deteta proliferação bacteriana, ou seja, positivou o frasco é retirado. Depois de passar álcool etílico na abertura do frasco e homogeneizado insere-se uma agulha e vira-se o frasco até caírem gotas em duas lâminas, para observação microscópica e nos meios de cultura COS e PVX. Após a extensão das gotas nas lâminas as preparações são coradas pelo Gram e devem ser examinadas sem demora, pois o aspeto morfológico pode orientar a escolha do antibiótico inicial. Os meios de cultura serão colocados na estufa durante 48 horas, numa caixa com gerador de CO₂. Caso haja crescimento valorizar o isolamento das estirpes prosseguindo para a identificação e testes de suscetibilidade aos antibiogramas. Na presença de mais de três estirpes é dado como contaminação e deve ser interpretada em função de um contexto clínico e bacteriológico – natureza e quantidade do microrganismo isolado e número de hemoculturas positivas.

Após cinco dias se as hemoculturas não positivarem dá-se o resultado como negativo (contudo, algumas estirpes precisam de mais tempo de incubação, como é o caso da *Brucella spp*).

Exsudato vaginal e uretral

Existem algumas infecções, como a gonorreia, sífilis e infecção por clamídias, que são comuns a ambos os sexos havendo diferenças quanto aos sintomas, locais e métodos de colheita da amostra. Além disso, certas infecções como a vaginite, infecção uterina, uretrite, vaginose, ulceração genital, cervicite, entre outras estão confinadas à mulher e as infecções mais comuns no homem são a uretrite gonocócica e não-gonocócica, prostatite e ulceração do pênis. (Colle *et al.*, 1993)

A flora vaginal varia consideravelmente consoante diversos fatores como pH vaginal, idade, atividade sexual e concentração de estrogénios na mucosa vaginal.

Tanto os exsudatos vaginais, como os uretrais são colhidos com zaragatoas secas e com meio de transporte de Amies e devem ser transportadas e processadas o mais rápido possível.

Diretamente com a zaragatoa fazem-se três esfregaços. Um para a preparação a fresco, com o objetivo de observar o movimento de *Trichomonas vaginalis*, a coloração de Gram (verificar a predominância de algum tipo morfológico) e a coloração de Wright (células, leucócitos, eritrócitos, fungos, parasitas). O exsudato vaginal é inoculado nos meios de PVX, SGC2, VCA3 e CNA e incubam a 37°C durante 48 horas. O meio de PVX e VCA3 ficam numa atmosfera de dióxido de carbono (CO₂). Medir o pH com tiras de medição de pH.

Num outro caso, pode ser pedida a pesquisa de estreptococos do grupo B, *Streptococcus agalactiae*. As mulheres grávidas colonizadas a nível da vagina e do reto com este microrganismo têm um risco aumentado de infetar o recém-nascido durante o parto. Por isso, no 3º trimestre de gravidez, entre a 34ª e 37ª semana de gravidez, faz-se a recolha com zaragatoas vaginais e anais, que são inoculadas no meio de enriquecimento Todd Hewitt (meio seletivo contendo antibióticos), durante 24 horas a 37°C. Após essas 24 horas replica-se para o meio sólido STRB e incuba-se a 37°C, em atmosfera com CO₂, durante 48 horas. Basta haver uma colónia rosa pálido a vermelho e redonda que é dado como positivo e é necessário fazer profilaxia (penicilina).

De modo geral, as infecções no homem são causadas pelos mesmos microrganismos que determinam as da mulher, mas raras vezes tais infecções são assintomáticas. A parte inferior da uretra pode estar fracamente colonizada por microrganismos diversos: *Staphylococcus spp.* coagulase negativa, bacilos Gram negativos, *Enterococcus spp.*, *Neisseria spp.* e *Corynebacteria sp.*. O procedimento para o exsudato uretral é semelhante, no sentido em que se fazem duas lâminas para a coloração de Gram (verificar a predominância de algum tipo morfológico) e a

coloração de Wright (células, leucócitos, eritrócitos, fungos, parasitas) e inocula-se para os meios de PVX e VCA3 e ficam na estufa a 37°C durante 48 horas, em atmosfera de CO₂.

Na Tabela X encontra-se as principais infecções do trato genital feminino e em ambos os sexos, assim como os microrganismos patogénicos causadores.

Tabela X - Principais infecções do trato genital

Infeções do trato genital feminino	
Vaginite	<i>Trichomonas vaginalis</i> <i>Candida albicans</i>
Vaginose bacteriana	<i>Gardnerella vaginalis</i> <i>Mobiluncus spp.</i> <i>Bacteroides spp.</i> <i>Prevotella spp</i>
Infeções comuns a ambos os sexos	
Gonorreia	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Sífilis	<i>Treponema pallidum</i>
Clamidiose genital	<i>Chlamydia trachomatis</i>
Cancroide (cancro mole)	<i>Haemophilus ducreyi</i>
Herpes genital	Vírus herpes simplex 1 e 2

Amostras do trato respiratório superior

O trato respiratório é composto pelo trato respiratório superior (cavidade nasal, faringe e laringe) e trato respiratório inferior (traqueia, brônquios e pulmões). Apesar das barreiras às infecções do trato respiratório, como a anatomia do trato respiratório, existência de pelos nasais, humidificação das fossas nasais e a flora normal da nasofaringe e orofaringe, que protegem o hospedeiro, uma vez que impedem a proliferação e invasão dos microrganismos patogénicos, porque competem pelos mesmos nutrientes e recetores. Contudo, com a idade, alterações no estado imunitário do hospedeiro, infecções sazonais podem levar a infecções do trato respiratório em que as mais comuns localizam-se na orofaringe, nasofaringe e cavidade nasal provocando a angina, corrimento nasal e, por vezes, febre. Porém, os microrganismos patogénicos da garganta podem infetar a laringe provocando rouquidão, o ouvido médio causando a otite média, com dores dos ouvidos, um seio paranasal, originando a sinusite, com dor facial ou da cabeça e os olhos, onde dão lugar à conjuntivite ou queratite. (Colle *et al.*, 1993)

As infecções do trato respiratório superior mais comuns são a constipação, gripe, faringite viral e bacteriana (*Streptococcus pyogenes*) e sinusite. Na maior parte dos casos, a

infecção primária é provocada por um vírus, embora este não seja, em geral, detetado. Algumas vezes acontece uma infecção secundária, por uma bactéria potencialmente patogénica, que se presentes na nasofaringe, tal como o pneumococo, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. (Colle et al., 1993)

Uma das infeções do trato respiratório superior é a faringite. A causa mais comum é a viral, contudo os estreptococos do grupo A, beta hemolíticos – *S. pyogenes* – é o agente etiológico mais isolado na faringite bacteriana. O diagnóstico e tratamento precoce da faringite estreptocócica do grupo A reduz a gravidade dos sintomas e a ocorrência de complicações adicionais, como febre reumática e glomerulonefrite aguda.

No laboratório de estágio o exame para a deteção de *Streptococcus sp.* grupo A, é um teste rápido pedido em contexto de urgência e com necessidade de resposta imediata para iniciação de terapêutica empírica. Este teste baseia-se num método imunocromatográfico e deteta qualitativamente o antigénio estreptocócico do grupo A a partir de amostras colhidas da garganta com zaragatoas. O resultado é obtido em apenas cinco minutos e é dado como positivo ou negativo.

A maior parte das vezes, a colheita nasal destina-se a detetar os portadores sãos e não como fins de diagnóstico. Os portadores nasais constituem uma fonte mais perigosa de contágio do que os que transportam o microrganismo na garganta, uma vez que disseminam muito maior número de microrganismos patogénicos do que estes últimos. (Colle et al., 1993) Com a zaragatoa nasal pode ser feita a pesquisa de eosinófilos, em que não se usam meios de cultura, apenas é feito um esfregaço numa lâmina, que é corada com a coloração de Wright); pesquisa de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à metilina) em que se usa o meio de cultura MSA2; exame cultural em que se usam os meios de cultura PVX, CNA e MSA2, em que é colocado um disco de cefoxitina neste último meio e duas lâminas coradas com Gram e Wright.

Amostras do trato respiratório inferior

Ao contrário da maior parte das regiões do trato respiratório superior, a traqueia, brônquios e pulmões estão normalmente isentos de colonização por bactérias comensais e potencialmente patogénicas, mas quando as suas defesas são afetadas ficam sujeitos a invasão pelos microrganismos da garganta. (Colle et al., 1993)

As infeções do trato respiratório inferior resultam da inalação de aerossóis infecciosos, tais como o bacilo da tuberculose e o da tosse convulsa, ou se for envolvido em infeções generalizadas, como o sarampo e a varicela, aspiração de conteúdos orais ou gástricos e disseminação hematogénea e ocorrem, porque as barreiras do trato respiratório superior

foram ultrapassadas. As mais comuns são a bronquite ou bronquiolite, pneumonia, legionelose ou doença do legionário e empiema. Em muitos, ou na maior parte dos casos, a infecção primária é provocada por um vírus (por exemplo, rinovírus, adenovírus, entre outros), mas ocorre frequentemente a infecção secundária bacteriana, por um germe patogénico proveniente da nasofaringe, em regra o pneumococo ou *Haemophilus influenzae*. Outros invasores secundários do trato respiratório inferior são *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

O produto biológico mais frequentemente submetido a análise bacteriológica é a expetoração. Neste tipo de amostra é importante avaliar a qualidade e quantidade do produto, uma vez que há dificuldades quer na colheita, quer na interpretação de resultados da respetiva cultura. A expetoração devido a uma infecção bacteriana é purulenta e contém material opaco, verde ou amarelo, assim como secreção mucoide.

A expetoração deve ser colhida pela manhã, porque é quando está mais concentrada e o indivíduo deve expetorar com tosse profunda. Saliva não é aceite por não ser uma amostra representativa do trato respiratório inferior e os resultados poderão ser falseados, e caso não consiga expetorar, a amostra deve ser aspirada com a ajuda de um aparelho.

Em todas as amostras de expetoração deverão pesquisar-se o pneumococo, *Haemophilus sp.* e outros agentes patogénicos aeróbios que infetam frequentemente os brônquios e os pulmões. Se houver mais do que dez leucócitos por célula epitelial há a probabilidade de que a amostra provenha de um local infetado do trato respiratório inferior; se houver menos do que dez leucócitos por célula epitelial é possível que a amostra seja constituída sobretudo por saliva. Se houver predomínio de diplococos Gram-positivos (provavelmente pneumococos), pequenos e finos bacilos Gram-negativos (provavelmente *Haemophilus*) ou cocos Gram-positivos em cacho (provavelmente *S. aureus*).

De seguida inocular o produto biológico nos meios CNA, COS, HAE2 e MacConkey. O meio de CNA, COS e HAE2 ficarão na estufa a 37°C durante 48 horas, em atmosfera de CO₂. Se houver crescimento bacteriano nos meios de cultura o procedimento será a identificação bacteriana e os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos. Na gelose de CNA realiza-se o teste de optoquina. A espécie *S. pneumoniae* é geralmente sensível à optoquina (aparecimento de halo de inibição), o que o distingue dos outros estreptococos α -hemolíticos. Se houver crescimento à volta do disco é resistente e não se trata de *S. pneumoniae*.

Na Tabela XI encontram-se as infeções do trato respiratório superior e inferior, que já foram referidas e os respetivos microrganismos causadores.

Tabela XI - Infecções do trato respiratório superior e inferior

Infecções do trato respiratório superior	
Faringite bacteriana	<i>S. pyogenes</i>
Sinusite	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>S. aureus</i>
Otite média	<i>S. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i> <i>Moraxella catarrhalis</i>
Epiglotite	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b
Tosse convulsa ou coqueluche	<i>Bordetella pertússis</i> <i>Bordetella parapertussis</i>
Infecções do trato respiratório inferior	
Pneumonia	<i>S. pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b <i>Mycobacterim spp</i>
Legionelose	<i>Legionella spp</i>
Bronquite, bronquiolite	Vírus respiratórios <i>S. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i>
Empiema	<i>S. aureus</i> <i>S. pneumoniae</i> <i>S. pyogenes</i>

Feridas (abcesso, pus)

Diz respeito ao diagnóstico das principais infecções supurativas das feridas, queimadura, pele, úlceras, locais expostos à contaminação por diferentes variedades de microrganismos da pele, trato respiratório, trato alimentar ou meio ambiente. A infecção ocorre quando um ou mais microrganismos contaminantes vencem as defesas do organismo do hospedeiro, multiplicam-se e danificam os tecidos. A gravidade da infecção depende da virulência do microrganismo e da resistência do local e do próprio hospedeiro. (Colle *et al.*, 1993)

As feridas abertas que drenam são frequentemente colonizadas com microrganismos potencialmente patogénicos não relacionados com o processo infeccioso específico. Por conseguinte, é importante obter amostras da parte profunda da ferida após a limpeza da sua superfície. Os aspirados de um abcesso fechado devem ser obtidos do centro ou da parede do abcesso. (Murray *et al.*, 1998)

As infecções das feridas podem ser endógenas (provocadas por microrganismos que habitam em qualquer outra região do corpo do doente) e exógenas (a fonte do microrganismo infetante é exterior ao corpo do doente). Já as infecções dos tecidos moles estão, geralmente,

associadas à produção de pus e as bactérias que as provocam são designadas por piogénicas, tais como *S. aureus* e *S. pyogenes*.

Na tabela seguinte – Tabela XII - apresentam-se as infeções da pele e tecidos moles mais comuns, assim como os respetivos microrganismos causadores. As infeções clínicas classificam-se como bacterianas (ex. impetigo), virais (ex. verrugas), micobacterianas (ex. lepra), fúngicas (ex. dermatofitoses) e parasitoses.

Tabela XII - Infeções da pele e tecidos moles

Piodermas primárias	
Impetigo	<i>S. pyogenes</i> <i>S. aureus</i> (se bolhoso)
Erisipela	<i>S. pyogenes</i> <i>S. aureus</i>
Celulite	<i>S. pyogenes</i> <i>S. aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> (em crianças)
Foliculite	<i>S. aureus</i> Bacilos Gram negativo
Furúnculo e Carbúnculo	<i>S. aureus</i>
Paroníquia	<i>Candida spp.</i> <i>S. aureus</i> Bacilos Gram negativo
Eritrasma	<i>Corynebacterium minutissimum</i>
Infeções das estruturas mais profundas	
Mionecrose ou Gangrena gasosa	<i>Clostridium spp.</i>
Manifestações cutâneas como resultado de produção de toxinas	
Síndrome da pele escaldada estafilocócica	<i>S. aureus</i> (toxina esfoliativa)
Síndrome do choque séptico ou choque tóxico	<i>S. aureus</i> (exotoxina F)
Escarlatina	<i>S. pyogenes</i>
Outros agentes infecciosos	
Lepra	<i>Mycobacterium leprae</i>

Para o laboratório de estágio as zaragatoas que chegam ao laboratório são tratadas como feridas, enquanto que o pus tem de vir num frasco ou seringa para ser processado como tal (e para não inviabilizar eventuais anaeróbios), uma vez que em caso de atraso no transporte das amostras existe o risco de secarem no interior do algodão da zaragatoa. Contudo, antes da inoculação do produto nos meios de cultura é feita uma suspensão com soro fisiológico.

Para as feridas os meios de cultura usados são o CNA e MCK, em que o primeiro ficará em atmosfera de CO₂ durante 48 horas a 37°C e uma lâmina para a coloração de Gram. Se houver crescimento bacteriano no meio CNA procede-se ao teste da catalase para diferenciar estafilococos (catalase positiva) de estreptococos (catalase negativa) e consoante

o resultado continua-se com a identificação bacteriana e respetivos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos.

No caso do pus são feitas duas lâminas para a coloração de Gram e de Ziehl-Neelsen e semear o produto biológico para os meios de cultura PVX, COS, MCK e caldo BHI (para o enriquecimento de aeróbios e anaeróbios exigentes) e incubar durante 48 horas a 37°C. Verificar se há desenvolvimento bacteriano ou não e, se houver continuar os procedimentos para a identificação e respetivos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos. Se, ao fim de 24 a 48 horas houver crescimento no caldo BHI revelada pela turvação do líquido sobrenadante, mas ausência de desenvolvimento nas placas, deve examinar-se ao microscópio a cultura do caldo e obter subculturas em aerobiose e anaerobiose.

Caso Clínico

Um menino de 2 anos, deu entrada nas urgências com quadro clínico de diarreia com sangue e muco e apresenta febre. O médico pediu uma coprocultura e pesquisa de antigénio Rotavirus e Adenovirus, em que ambos deram negativo.

Na coprocultura usam-se dois meios de cultura sólidos - Campyloset e MacConkey - e um meio líquido – Selenito F-T.

O meio líquido é um meio seletivo para a *Salmonella* e a *Shigella* destinando-se ao enriquecimento da *Salmonella* a partir das fezes, favorecendo o seu crescimento no seio de uma flora polimicrobiana. Após 24h, o caldo deve ser repicado para meios destinados à deteção da *Salmonella*, meio de cultura sólido Hektoen, que é seletivo de isolamento e diferenciação para a *Salmonella* e *Shigella*.

O meio de MacConkey é seletivo para o isolamento e diferenciação de alguns bacilos Gram negativos, como enterobactérias, entre as quais a *E. coli*. Após o tempo de incubação houve crescimento bacteriano, em que as colónias eram rosa e, portanto, negativo para *Shigella* e *Salmonella*. Se fosse *Salmonella* ou *Shigella* as colónias não são fermentadoras da lactose, ou seja, apresentam-se incolores.

O *Campylobacter sp.* é constituído por bacilos Gram negativo, móveis com flagelo polar, com uma forma muito peculiar, seja em bastonete, espiral, em S ou curvo. Para o isolamento desta bactéria utilizou-se meio Campyloset, incubando a 42°C em atmosfera microaerofílica. Verificou-se crescimento de colónias pequenas e acinzentadas (Figura 16). Procedeu-se aos

testes de catalase e de oxidase, em que ambos deram positivos. De seguida foi feito um Gram de colónias dessa mesma placa com o objetivo de verificar a morfologia das bactérias (Figura 17).

Neste caso a placa CAM e amostra de fezes são enviadas para o Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa (CMLGS), em Lisboa, para confirmação com a tecnologia inovadora Maldi-TOF [Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) é uma técnica espectral, que pode ser aplicada na análise da composição química celular dos microrganismos, gerando rapidamente um fingerprint molecular para identificação microbiana. A excelente reprodutibilidade desta técnica baseia-se na análise das proteínas ribossomais, que são expressas de forma constante e existem em abundância dentro das células] e eventual TSA. Dias depois confirmou-se o diagnóstico.

A maior parte destas infeções são de origem alimentar ou do contacto com animais infetados. O controlo depende da higiene e manipulação dos alimentos e o contacto com os animais. A eritromicina é o fármaco de eleição. Contudo, a tetraciclina e a gentamicina também poderão ser utilizados.



Figura 16 - Crescimento bacteriano no meio de cultura Campylosel
Fonte da figura: Fotografia tirada no decorrer do estágio laboratorial



Figura 17 - Microrganismo do género *Campylobacter* spp. Observar os bacilos curvos.

Fonte da figura:

<https://www.semanticscholar.org/paper/Evaluation-of-detection-methods-for-Campylobacter-Mushi-Paterno/441b2be29115ef07f6f9d58eb74510452f0b6b5c/figure/4>

Conclusão

Ao longo do estágio todas as dúvidas e incertezas que tinha foram desaparecendo, porque com o tempo fui percebendo que para nós, profissionais da saúde, é gratificante podermos promover a saúde e bem-estar do próximo.

Este estágio foi fundamental para consolidar os conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do mestrado, adquirir novos, ganhar noção da importância do controlo da qualidade laboratorial, do funcionamento dos equipamentos, da rotina laboratorial e da validação de resultados, uma vez que desconhecia a realidade laboratorial até então. Entender que para tudo funcionar com normalidade é importante ter espírito de equipa e de entreajuda, assumir os erros e executar as tarefas com responsabilidade e rigor.

Em suma, sem dúvida que esta experiência me enriqueceu, quer a nível pessoal, quer a nível profissional e saio dela com a certeza de estou pronta para enfrentar os desafios do futuro.

Bibliografia

BARROSO, Helena; MELIÇO-SILVESTRE, António; TAVEIRA, Nuno - **Microbiologia Médica I**. Lisboa : LIDEL - Edições Técnicas, Lda, 2014. ISBN 978-989-752-057-0.

bioMérieux - [Em linha], atual. 2018. [Consult. 20 jul. 2019]. Disponível em WWW:<URL:https://www.biomerieux.pt/>.

BROOKS, Geo. F. *et al.* - **Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 26. ed. Porto Alegre : Ltda., AMGH Editora, 2014. ISBN 978-85-8055-335-2.

COLLE, J. G. *et al.* - **Microbiologia Médica**. Lisboa : Fundação Calouste Gulbenkian, 1993. ISBN 972-31-0416-4.

FARMACÊUTICA, Glaxo-Lda. - **Bacteriologia Clínica**. Lisboa : [s.n.]

FONSECA, Ana Bruschy *et al.* - Orientações para elaboração de um manual de boas práticas em Bacteriologia. **Ministério da Saúde Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge - 40**. 2004).

Germano de Sousa - Centro de Medicina Laboratorial - [Em linha] [Consult. 13 jul. 2019]. Disponível em WWW:<URL:https://www.germanodesousa.com/>.

HAMID, Gamal Abdul - **Clinical Hematology**. 1. ed. Áden : Faculty of Medicine and Health Sciences University of Áden, 2014

HOFFBRAND, A. Victor; MOSS, Paul A. H. - **Hoffbrand's Essential Haematology**. 7. ed. Chichester : Ltd, John Wiley & Sons, 2016. ISBN 978-1-118-40867-4.

MURRAY, Patrick R. *et al.* - **Microbiologia Médica**. 3. ed. Rio de Janeiro : S.A., Guanabara Koogan, 1998

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. - **Microbiologia Médica**. 7. ed. Rio de Janeiro : Elsevier, 2014. ISBN 978-85-352-7978-8.

THEML, Harald; DIEM, Heinz; HAFERLACH, Torsten - **Color Atlas of Hematology Practical Microscopic and Clinical Diagnosis**. 2. ed. Nova Iorque : Thieme, 2004. ISBN 3136731026.