



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Verónica Estanqueiro Ferreira de Almeida

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas,
orientado pela Professora Doutora Ana Miguel Matos e pelo
Dr. Luís Morais e apresentado à Faculdade de Farmácia
da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2020



UNIVERSIDADE D COIMBRA

Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

RELATÓRIO DE ESTÁGIO Mestrado em Análises Clínicas

Verónica Estanqueiro Ferreira de Almeida

Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Ana Miguel Matos e pelo Dr. Luís Morais e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Estágio Curricular desenvolvido no Centro Hospitalar do Médio Tejo, E.P.E., no período decorrido entre 2 de dezembro de 2019 a 11 de março de 2020 e 8 de junho a 7 de agosto, nas valências de Hematologia, Química Clínica, Imunologia e Microbiologia. Sendo estas últimas – Microbiologia e Hematologia – as valências por mim escolhidas para uma abordagem mais profunda neste relatório.

outubro de 2020

Índice

Índice de Figuras.....	iv
Índice de Tabelas.....	iv
Agradecimentos	v
Abreviaturas, Acrónimos, Siglas e Símbolos.....	vii
Resumo	xi
Abstract	xiii
Introdução	1
Objetivo	1
1. Caracterização do Centro Hospitalar do Médio Tejo, E.P.E.	2
1.1. Apresentação.....	2
2. Caracterização do SPC do CHMT	2
3. Fases do Processo Laboratorial	3
4. Critérios de aceitação de amostras para análise.....	4
4.1. Amostra inadequada para análise.....	4
5. Fluxograma Geral.....	6
6. Controlo de Qualidade (CQ).....	8
6.1. Controlo de Qualidade Interno (CQI).....	8
6.2. Avaliação Externa da Qualidade (AEQ).....	11
Atividade Desenvolvidas	12
I. Química Clínica.....	12
II. Imunologia.....	12
Autoimunidade.....	14
III. Hematologia	15
Hemograma	16
Eritrograma.....	17
Hematócrito - HTC.....	17
Hemoglobina (Hb).....	17
Contagem diferencial de WBC	19
Contagem total de Reticulócitos	20
Índices hematimétricos, VCM, HCM e CHCM:	20
Esfregaço de sangue periférico e coloração May-Grünwald-Giemsa	21
Alterações das series Eritrocitária, Leucocitária e Plaquetar	22
1. Série Eritrocitária ou Vermelha.....	22
2. Série Leucocitária ou Branca.....	23

3. Série Plaquetar.....	24
Velocidade de Sedimentação eritrocitária (VS).....	24
Hemostase	25
Cascata da Coagulação	26
Avaliação laboratorial da hemostase	27
Determinação do Tempo de Protrombina (TP)	27
International Normalized Ratio (INR).....	27
Determinação do Tempo de tromboplastina Parcial Ativada (aTTP)	28
Determinação do Tempo de Trombina (TT) – Coagulação Especial.....	28
Determinação do Fibrinogénio	29
Determinação do Anticoagulante Lúpico – Coagulação Especial.....	29
Determinação dos D-dímeros	30
IV Microbiologia.....	31
IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS E OUTROS MICRORGANISMOS.....	32
1. Exame direto a fresco.....	32
3. Exame direto com coloração: coloração Kinyoun (ou Ziehl-Neelsen Modificada) e Auramina O	33
4. Provas clássicas de identificação bacteriana.....	34
a. Prova da catalase	34
b. Prova da coagulase	35
c. Prova da oxidase (citocromo-oxidase).....	35
d. Prova da urease.....	35
e. Teste de suscetibilidade à Optoquina.....	36
5. Outros testes de pesquisa de MO realizados no SPC	36
a. Teste de Identificação da <i>Escherichia coli</i> O157:H7	36
b. Teste para identificação de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	36
c. Teste <i>Screening</i> para <i>Streptococcus</i> do Grupo A	37
d. Teste <i>Screening</i> para <i>Streptococcus pneumoniae</i>	37
e. Teste <i>Screening</i> para <i>Legionella pneumophila</i>	37
f. Teste <i>Screening</i> para <i>Clostridioides difficile</i>	37
g. Teste <i>Screening</i> para <i>Campylobacter</i> spp.....	38
6. Métodos de identificação e TSA automatizados.....	39
Sistema Vitek®2	39
7. Identificação de fungos filamentosos	41
MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NO SETOR DE MICROBIOLOGIA – SPC	41
PROCESSAMENTO DAS AMOSTAS	42

Tipos de sementeiras	42
Amostras	43
1. Urina	44
2. Sangue.....	45
3. Ponta de catéter.....	46
4. Secreções Respiratórias	47
5. Fezes	48
6. Líquidos de serosas	50
7. Exsudados purulentos.....	51
8. Exsudados vaginais.....	52
9. Exsudados para rastreios (<i>screening</i>) epidemiológicos	52
10. LCR.....	53
MICOBACTERIOLOGIA	54
Conclusão.....	57
Referências Bibliográficas.....	59
ANEXOS	65

Índice de Figuras

Figura 1 - Fluxograma geral do SPC do C.H.M.T.	7
Figura 2 - Fatores que contribuem para autoimunidade	14
Figura 3 - Diagrama de dispersão dos leucócitos. (SFL/SSC)	20
Figura 4 - Execução de ESP	22
Figura 5 - Cascata da coagulação	26
Figura 6 - Passos manuais da coloração de Gram	33
Figura 7 - Técnicas de sementeira: por esgotamento (à esquerda) e para	43
Figura 8 - Técnica de sementeira por espalhamento/ sementeira em toalha com zaragatoa...84	

Índice de Tabelas

Tabela I - Plano do CQI do setor de Hematologia.....	67
Tabela II - Estirpes bacterianas disponíveis (manipuladas semanalmente de acordo com a ordem estabelecida) e o seu respetivo teste ID e TSA (executados no equipamento automático – Vitek®2)	68
Tabela III - Avaliação Externa da Qualidade no SPC-CHMT 2020.....	69
Tabela IV - Equipamentos utilizados na pesquisa dos parâmetros bioquímicos realizados no SPC.	70
Tabela V - Técnicas de serologia manual e patologias associadas, realizadas no SPC.	71
Tabela VI - Equipamentos e o respetivo método analítico utilizados na determinação de parâmetros analíticos de Imunologia.....	72
Tabela VII - Exemplos de doenças autoimunes sistémicas e os seus Ags (Self) correspondentes.....	77
Tabela VIII - Exemplos de doenças autoimunes específicas de órgão, com o órgão-alvo e os principais Acs envolvidos na patologia que desencadeia.	77
Tabela IX - Resumo do método e correspondentes parâmetros medidos no Sysmex XN-1000™.	78
Tabela X - Valores de referência para os parâmetros estudados.	78

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Alice e Diniz, e irmã Carolina por todo o carinho e apoio dado nesta fase da minha vida, em que decidi mudar o rumo do meu percurso profissional e enveredei no ramo das Análises Clínicas – sem eles não seria possível. Obrigada mãe, pai e mana!

Carminho e Francisco, mesmo sem perceberem o que a tia fazia e porque às vezes se ausentava: o vosso sorriso dava-me coragem para nunca desistir.

Agradeço também ao Dr. Carlos Cortes por ter permitido o estágio no seu serviço e por ter sido sempre prestável. Um especial agradecimento ao meu orientador, Dr. Luís Morais, pela paciência e pelos ensinamentos transmitidos.

A toda a equipa do laboratório: médicos, técnicos superiores e técnicos superiores de diagnóstico e terapêutica. Destacando a Dra. Paula Gama, mais que uma médica prestável e dotada de um conhecimento sem fim, transmitiu-me o gosto especial pela Microbiologia, ensinou-me, repetiu as vezes que foram precisas, sempre incansável e disponível, é uma amizade que levo para a vida. Obrigada Paula!

Aos internos de formação específica que tanto me ajudaram, sempre em busca dos “porquês” das coisas, sempre em alerta quando surgia algo diferente, grupo de jovens médicos fantásticos e dedicados: Hélder, Rita e Jóni agradeço-vos o carinho que tiveram comigo. Ao Rui, um técnico superior incrível, dotado de grande conhecimento, fica também um agradecimento especial.

Por último, mas não as últimas, às minhas amigas Patrícia e Raquel: obrigada por estarem sempre por perto, por sempre me incentivarem e compreenderem as minhas ausências nas épocas de maior estudo. Ao meu grande amigo Daniel, aquele que considero um irmão, agradeço-lhe toda a sua ajuda, generosidade e amizade. Às minhas amigas do mestrado, as minhas meninas e companheiras nesta jornada: Vanessa, Joana e Catarina, obrigada pelo vosso companheirismo! Sem vocês tudo teria sido diferente!

Ao Luís por conseguir sobreviver ao mau-humor em épocas de exames, às minhas ausências para estudar, para escrever o relatório... a ti meu querido: obrigada!

Abreviaturas, Acrónimos, Siglas e Símbolos

Ac(s) – Anticorpo(s)

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AEQ – Avaliação Externa da Qualidade

Ag(s) – Antigénio(s)

AO – Assistente Operacional

AR – Artrite reumatoide

ARN – Ácido ribonucleico

ATCC – *American Type Culture Collection*

aTTP – Tempo de tromboplastina parcial ativada

BAAR – bacilos ácido-álcool resistentes

CHCM – Concentração de Hemoglobina Cospuscular Média

CHMT – Centro Hospitalar do Médio Tejo, Entidade Pública Empresarial (E.P.E.)

CIVD – Coagulação intravascular disseminada

CMV – Citomegalovírus

COS – Gelose de Sangue

COS – Gelose de Sangue Colombia

CQ – Controlo de Qualidade

CQE – Controlo de qualidade externo

CQI – Controlo de Qualidade Interno

CV – Coeficiente de Variação

dRVVT – tempo do veneno da Víbora de Russel

DS – Diretor de Serviço

EBNA – Antigénio Nuclear do *Epstein Barr*

EBV – Vírus *Epstein Barr*

ELFA – Enzyme Linked Flourescent Assay

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Imunoensaio enzimático)

EM – Esclerose múltipla

ESP – Esfregaço de sangue periférico

FEIA – Imunoensaio fluoroenzimático

FFC – Fluorescence flow cytometry

FL – Fosfolípido

FSC – Forward scatter

FT – Fator tecidual

FvW – Fator de *von Willebrand*
FX – Fator X (dez)
GDH – Desidrogenase específica do Glutamato
Hb – Hemoglobina
HCM – Hemoglobina Cospuscular Média
HCO – Hipocoagulação oral
HKT – Hektoen
HTC – Hematócrito
ID – Identificação
IF – Imunofluorescência Indireta
INR – International Normalized Ratio
INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
ISI – Índice de sensibilidade Internacional
IT – Instrução de Trabalho
K3-EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássio (*tripotassium ethylenediaminetetraacetic acid*)
LCR – líquido cefalorraquidiano
LES – Lúpus eritematoso sistémico
M.O. – microorganismo
MNT – Micobactérias não tuberculosas
MRSA – Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*/ *Staphylococcus aureus* metilina resistentes
OMS – Organização Mundial de Saúde
PCQ – Programa de Controlo de Qualidade
PCR - *Polymerase Chain Reaction*
PDW – Coeficiente de Dispersão Plaquetar (do inglês *Platelet Distribution Width*).
PLT – Plaquetas
PT – Tempo de protrombina
RBC – *Red Blood Cells*
RDW – Coeficiente de Dispersão Eritrocitária (do inglês *Red Cell Distribution Width*)
RSV – *Respiratory Syncytial Virus* - Vírus Sincicial Respiratório
SFL – Side fluorescence
SPC – Serviço de Patologia Clínica
SSC – Side scatter
SU – Serviço de Urgência

TORCH – Toxoplasmose – Outras doenças – Rubéola – Citomegalovírus – Herpes
TSA – Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos
TSA – Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos
TSDT – Técnico Superior de Diagnóstico e Terapêutica
TSS – Técnico Superior de Saúde
TT – Tempo de trombina
UFC – Unidade formadoras de colónias
VCM – Volume Cospuscular Médio
VPM – Volume Plaquetar Médio
VRE – *Enterococcus* Resistente à Vancomicina
VS – Velocidade de sedimentação
VS – Velocidade de sedimentação
WBC – *White Blood Cells*

Resumo

Um diagnóstico, para que seja assertivo, faz-se com base numa multiplicidade de fatores, em que os resultados biopatológicos desempenham um papel fulcral. Tais resultados advêm da análise detalhada de diferentes amostras biológicas, sendo o sangue e a urina os mais utilizados. Através destas amostras consegue determinar-se uma enorme variedade de parâmetros analíticos num laboratório, tais parâmetros são chamados de “meios complementares de diagnóstico e terapêutica” e contribuem para o diagnóstico, tratamento, e monitorização de doenças.

As análises clínicas encontram-se divididas em 4 valências principais, que são: Imunologia, Hematologia, Microbiologia e Química Clínica. Este relatório de estágio tem como objetivo descrever os conceitos teóricos que estão na base dos parâmetros analíticos avaliados em cada setor, as metodologias utilizadas, a rotina laboratorial, os equipamentos disponíveis e, por fim, o Controlo de Qualidade. O estágio decorreu durante 6 (seis) meses no Centro Hospitalar do Médio Tejo, E.P.E. (CHMT) – Hospital Nossa Senhora da Graça, localizado em Tomar. O CHMT é constituído por mais duas unidades hospitalares, localizadas em Abrantes e Torres Novas.

No Serviço de Patologia Clínica (SPC) do CHMT- Tomar tive contacto com todos estes setores, contudo, a Microbiologia e a Hematologia foram as selecionadas para uma descrição mais detalhada; relativamente à Química Clínica e à Imunologia irei fazer uma breve descrição dos setores.

Palavras-chave: Análises Clínicas, Amostras Biológicas, Hematologia, Imunologia, Microbiologia, Química-Clínica, Controlo de Qualidade.

Abstract

A diagnosis is made on the basis of a multiplicity of factors, in which biopathological results play a key role in making the diagnosis assertive. Such results come from the detailed analysis of different biological samples, blood and urine are the most used, it is through these samples that a huge variety of analytical parameters can be determined in a laboratory and thus the clinician can complement or even confirm a diagnosis and/or pathology.

The clinical analyses are divided into 4 main valences: Immunology, Haematology, Microbiology and Clinical Chemistry. This internship report aims to describe the theoretical concepts underlying each sector, the methodologies used, the laboratory routine, the equipment used and, finally, Quality Control. The internship took place for 6 (six) months at Centro Hospitalar do Médio Tejo, E.P.E. (CHMT) - Hospital Nossa Senhora da Graça, located in Tomar. The CHMT consists of two more hospitals, located in Abrantes and Torres Novas.

In the Clinical Pathology Service (SPC) of the CHMT- Tomar I had contact with all these sectors, however, Microbiology and Hematology were the ones selected for a more detailed description; regarding Clinical Chemistry and Immunology I will make a brief description of the sectors.

Keywords: Clinical Analysis, Biological Samples, Hematology, Immunology, Microbiology, Clinical Chemistry, Quality Control.

Introdução

As Análises Clínicas constituem um importante meio complementar de diagnóstico e desempenham um papel fulcral na prestação de cuidados de saúde, contribuindo para que haja uma prevenção e deteção precoce da doença. De notar que grande parte das decisões médicas (70%) é tomada tendo em conta os dados fornecidos pelo laboratório, isto é, o resultado da validação biopatológica.

As Análises Clínicas acolhem profissionais de variadíssimas áreas: médicos, farmacêuticos, biólogos, bioquímicos e técnicos de análises clínicas. Sendo uma área multidisciplinar onde a biologia, fisiologia, química, imunologia, microbiologia, hematologia se cruzam e/ou convergem é fundamental que haja a interligação de conceitos pois todos eles se relacionam e num diagnóstico todos eles se complementam.

O Estágio Curricular do Mestrado de Análises Clínicas decorreu, ao longo de 6 meses, no SPC do CHMT. Fui integrada na equipa do SPC onde realizei o trabalho técnico propriamente dito, interpretei os valores de modo a poder fazer uma validação biopatológica dos resultados obtidos, sob a orientação do Dr. Luís Morais.

A Microbiologia e a Hematologia serão alvo de uma abordagem mais profunda, contudo irei fazer uma breve referência à Química-Clínica, e Imunologia, focando-me no objetivo de cada valência, nas rotinas laboratoriais, nas metodologias utilizadas e nos parâmetros analisados.

Por fim, para que um laboratório obtenha resultados fidedignos é preciso que este tenha implementado um programa de Controlo de Qualidade Interno e Externo. O SPC é um serviço certificado, onde o rigor impera na obtenção dos resultados.

Objetivo

O objetivo deste relatório de estágio é a articulação dos conhecimentos teóricos com a prática laboratorial, isto é, conseguir que se faça a “ponte” entre o que foi ensinado ao longo do Mestrado e o que se faz efetivamente na prática laboratorial, adquirir métodos de trabalho e competências, e consolidar conhecimentos.

I. Caraterização do Centro Hospitalar do Médio Tejo, E.P.E.

I.1. Apresentação

O Centro Hospitalar do Médio Tejo, E.P.E. integra três unidades hospitalares, localizadas em Abrantes, Tomar e Torres Novas. O CHMT tem uma área de influência que engloba 15 concelhos, servindo uma população de cerca de 266 mil habitantes.

A sua missão é prestar cuidados de saúde diferenciados, com eficiência e qualidade, em articulação com outros serviços de saúde e sociais da comunidade, a custos comportáveis, aos utentes da área de influência do Médio Tejo, promovendo a complementaridade entre os hospitais e apostando na motivação e satisfação dos seus profissionais.

Tem como objetivo o tratamento e a reabilitação, em tempo clinicamente adequado, dos doentes, em condições ótimas de qualidade e humanidade dos serviços prestados.

O CHMT rege-se pelo princípio de acesso ao Serviço Nacional de Saúde, de acordo com as regras de organização e as redes de cuidados de saúde ⁽¹⁾.

2. Caracterização do SPC do CHMT

O SPC está centralizado na Unidade de Tomar – piso 2, com espaços definidos para cada um dos setores, sala de colheitas e gabinete de consulta de Hipocoagulação Oral (HCO). De notar que, em cada Unidade Hospitalar, o Serviço de Patologia Clínica dá resposta aos pedidos do internamento e da urgência. Cada setor tem um responsável: Dra. Eduarda Campos – Química-Clínica e Imunologia, Dr. Moshen Rostami – Hematologia, Dra. Paula Gama – Microbiologia.

O Serviço é constituído por uma vasta equipa multidisciplinar: Médicos Especialistas em Patologia Clínica, Médicos de Formação Específica de Patologia Clínica, Farmacêuticos, Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica (TSDT), Técnicos Superiores de Saúde (TS) (Biólogos e Bioquímicos), Assistentes Técnicos (AT) e Assistentes Operacionais (AO).

O SPC tem como responsável máximo o Diretor de Serviço (DS) – o Senhor Dr. Carlos Cortes – Médico Patologista Clínico. A coordenação dos TSDT é da responsabilidade de Sandra Paredes – TSDT.

Cabe aos AT a inscrição dos utentes para as respetivas colheitas, que tendo como base as requisições médicas, os registam no Sistema Integrado Laboratorial (*Modulab*) da Werfen[®].

Neste processo é atribuído um número de pedido ao utente, anexado a um número processo, saindo as respetivas etiquetas para os tubos e/ou contentores que vão ser posteriormente utilizados para a colheita. Essa etiqueta é composta por: Nome do utente, sexo, data de nascimento/idade, data do pedido (normalmente coincide com a data da colheita do produto), tipo de produto, serviço que requisitou e código de barras; estes dados confinados a uma etiqueta identificativa facilitam o fluxo das amostras. O utente é chamado para a sala de colheitas sendo fundamental a correta identificação do mesmo e pede-se ao utente que confirme o seu nome completo fornecendo outro dado identificativo – dupla verificação.

As amostras de utentes internados no CHMT e no Serviço de Urgência (SU), são colhidas nos serviços onde se encontram e posteriormente enviadas para o SPC.

A amostra deve ser enviada o mais rapidamente possível para o laboratório, sendo mantida à temperatura ambiente, refrigerada ou congelada, consoante as determinações específicas para cada análise. Devido à centralização do SPC para Tomar, o envio das amostras das outras unidades exige condições de envio e acondicionamento, asseguradas pelos TSDT/TS.

3. Fases do Processo Laboratorial

O objetivo de um laboratório clínico passa por garantir que os resultados dos testes realizados não contenham erros de importância clínica e assegurar que todas as etapas do processo sejam cumpridas.

Alguns resultados analíticos podem ser influenciados por uma série de variáveis que vão desde a ingestão prévia de alimentos, à posição do utente durante a colheita, ao uso de determinados fármacos, ao tempo de estase venosa, etc. Por estas razões, as colheitas devem ser padronizadas, tendo em conta as condições de pré-colheita que existem para os vários parâmetros, as condições de colheitas, o manuseamento das amostras após colheita e o seu transporte para o SPC.

O processo laboratorial compreende **3 fases**:

- **Fase pré-analítica** – esta fase envolve a identificação do utente, o pedido da(s) análise(s) por parte do médico, a preparação do utente, a colheita, o transporte e a preparação dos tubos para realizar a análise. A fase pré-analítica é um processo fundamental na atividade do laboratório. Devido à comunicação com doentes, clínicos e outros profissionais, à dispersão geográfica dos pontos de colheita, à diversidade dos profissionais do laboratório envolvidos e à panóplia de procedimentos na preparação, colheita, tratamento e transporte das amostras

biológicas, faz com que a fase pré-analítica seja a fase em que ocorre o maior número de não conformidades e de erros laboratoriais ⁽²⁾.

- **Fase analítica** – fase do processamento das amostras, de acordo com a conduta adotada pelos vários setores, de modo a que seja assegurada a qualidade dos resultados, com base numa regular verificação dos equipamentos em uso, do estado dos reagentes e de outros consumíveis, bem como no cumprimento dos procedimentos de calibração e controlo de qualidade.

- **Fase pós-analítica** – esta fase engloba todos os procedimentos ou processos que ocorrem após a análise das amostras. A fase da validação biopatológica pelo Especialista, tem em conta a interpretação crítica, integrando a informação clínica que consta na requisição do pedido de análises, a análise comparativa com resultados anteriores e o enquadramento destes no contexto clínico. Há uma série de normas a cumprir ao longo desta fase: atuação perante resultados anómalos ou inesperados – conhecer as condições da amostra (hemolisada, lipémica, presença de fibrina ou de coágulo), avaliar a necessidade de repetição do teste ou da própria colheita, dependendo da situação ⁽²⁾.

4. Critérios de aceitação de amostras para análise

4.1. Amostra inadequada para análise

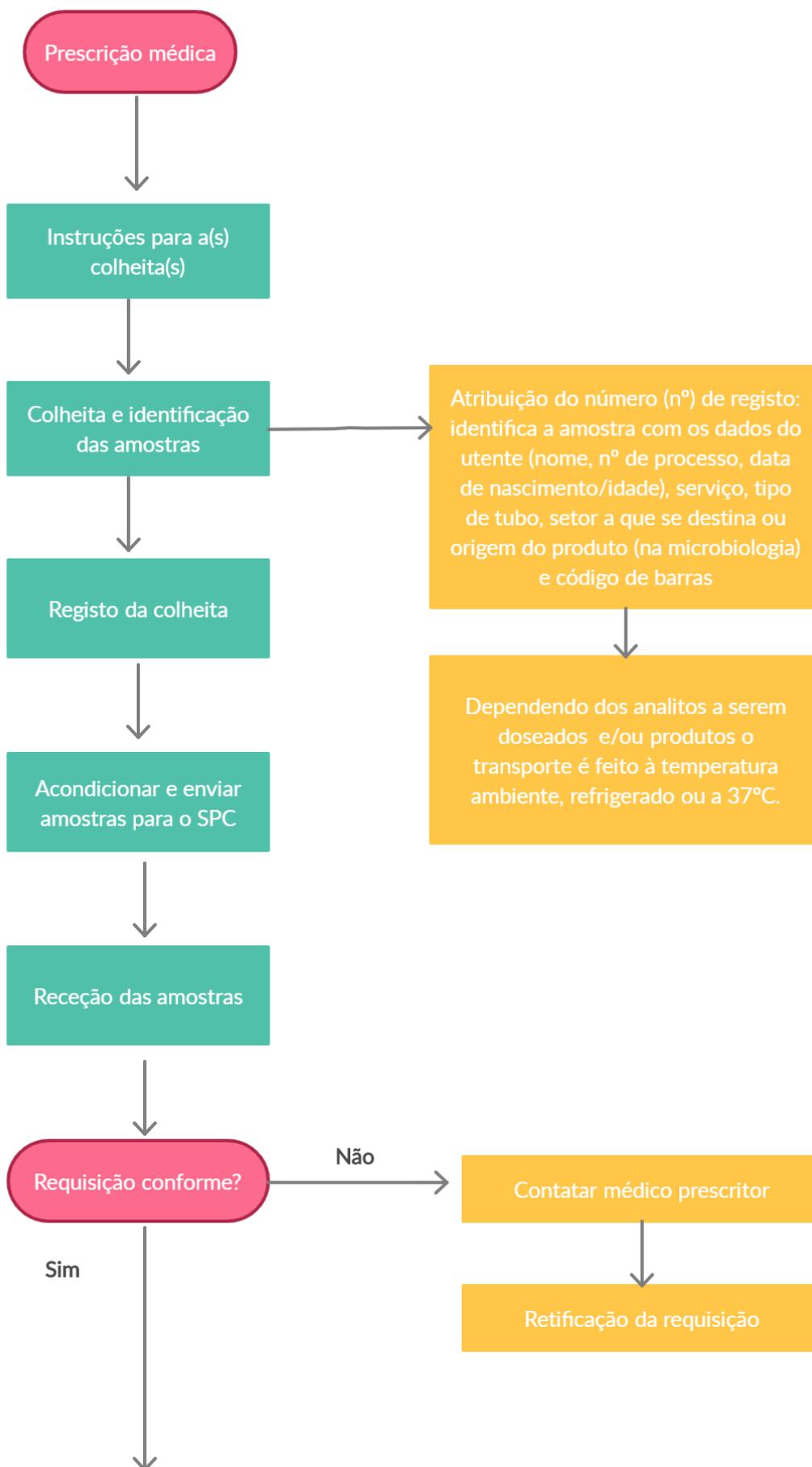
Tal como já foi referido anteriormente, a fase pré-analítica é aquela que concentra o maior número de erros laboratoriais e, conseqüentemente, a rejeição das amostras biológicas. A rejeição de uma amostra pode levar a uma repetição da colheita.

Destacam-se, de seguida, alguns critérios que levam à rejeição das amostras:

- ✓ Discrepância na identificação do utente entre a amostra e a requisição ⁽³⁾;
- ✓ Discrepância entre o tipo de amostra enviada e a requisição ⁽³⁾;
- ✓ Amostra sem identificação (nome e nº de processos do utente) ⁽³⁾;
- ✓ Contentor ou sistema de meio de transporte não apropriado para a amostra e/ou análise a efetuar ⁽³⁾;
- ✓ Volume inadequado de amostra ⁽³⁾;
- ✓ Condições inadequadas de colheita de amostra ⁽³⁾;
- ✓ Integridade do meio de transporte não assegurada ⁽³⁾;

- ✓ Verificação de más condições de conservação e estabilidade da amostra ⁽³⁾;
- ✓ Contaminação macroscópica da amostra ⁽³⁾;
- ✓ Presença de coágulos na amostra a analisar em que estes possam interferir no resultado ⁽³⁾;
- ✓ Amostras hemolisadas, lipémicas ou ictéricas, que interfiram nos resultados ⁽³⁾;
- ✓ Produto enviado em seringa com agulha ⁽³⁾;
- ✓ Amostras derramadas (resíduos de amostra no exterior do contentor/requisição) ⁽³⁾;
- ✓ Cateter não acompanhado de hemocultura ⁽³⁾;
- ✓ Proporção sangue-anticoagulante incorreta ⁽³⁾.

5. Fluxograma Geral



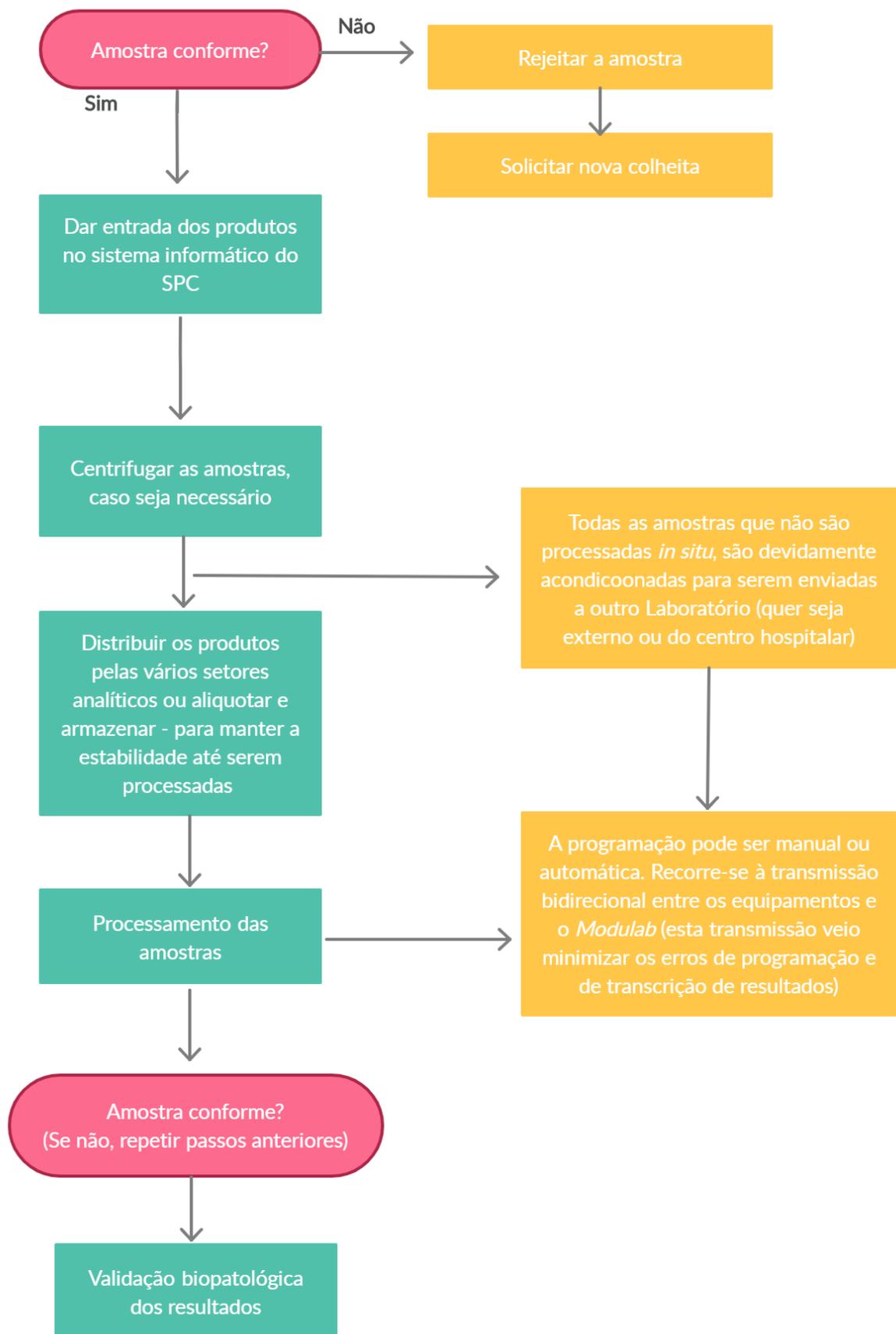


Figura I - Fluxograma geral do SPC do C.H.M.T.

6. Controlo de Qualidade (CQ)

Segundo o Manual de Boas Práticas Laboratoriais, define-se “Qualidade” como a “aptidão de um produto ou serviço para satisfazer as necessidades expressas ou implícitas do utilizador. No domínio dos exames laboratoriais, a qualidade é a adequação entre os meios utilizados às informações esperadas pelo médico prescriptor e às expectativas do doente”⁽⁵⁾.

Define-se CQ como um conjunto de técnicas e atividades usadas para cumprir os requisitos de qualidade – é um processo estatístico que monitoriza e avalia os processos analíticos utilizando dados reunidos através de ensaios com produtos de controlo de qualidade. Tem como objetivo assegurar a fiabilidade dos resultados analíticos dos utentes e como objetivo específico a redução da variabilidade dos resultados obtidos por intermédio do processo analítico⁽⁴⁾.

O desenvolvimento de um sistema da qualidade é imprescindível para o correto exercício profissional nos laboratórios. Assim, de modo a assegurar a qualidade e fiabilidade dos resultados é implementado um “Sistema da Qualidade (SQ)” – que se define como estrutura organizacional, responsabilidades, procedimentos, processos e recursos para implementação e gestão da qualidade⁽⁵⁾. Todo este processo abrange as fases pré-analítica, analítica e pós analítica.

6.1. Controlo de Qualidade Interno (CQI)

Define-se Controlo da Qualidade Interno (CQI) como um “conjunto de procedimentos postos em prática num laboratório com vista a permitir um controlo da qualidade dos resultados das análises à medida que as mesmas são executadas”⁽⁵⁾.

O CQI abrange, assim, todos os procedimentos assumidos pelo laboratório para conseguir a avaliação contínua do seu trabalho, cuja finalidade é assegurar a consistência dos resultados diários e a sua conformidade com critérios definidos, avaliando a precisão dos ensaios e dando indicação do momento para se promoverem ações corretivas quando surge uma não conformidade⁽⁶⁾.

O CQI tem como objetivo detetar problemas na rotina dos métodos aplicados num laboratório e mudanças na performance do método (ao longo do tempo)⁽⁴⁾.

O laboratório tem implementado um programa de CQI, que se torna indispensável na deteção de não conformidades (anomalias), avaliação de erros (e a sua imediata correção) e a consequente execução de ações corretivas e preventivas⁽⁷⁾.

Falar de CQI é falar de “Precisão” – a precisão avalia a variabilidade dos resultados analíticos em torno do verdadeiro valor e a concordância entre as medidas repetidas (reprodutibilidade). A precisão é afetada pelo erro aleatório.

No SPC, são processados diariamente CQI, contudo, os níveis de controlo e a periodicidade com que são feitos em cada setor, estão dependentes do que está estabelecido em Instruções de Trabalho (IT).

Assim, no setor da Imunologia e Química Clínica – todos os dias se colocam os controlos necessários: para as análises feitas diariamente no setor da Química Clínica, colocam-se dois (2) níveis de controlo de manhã e o 3º nível à tarde, ao contrário do setor da Imunologia, onde os 3 níveis são efetuados de manhã. Para as análises que se efetuam semanalmente colocam-se três (3) níveis no dia da semana estipulado para a análise de acordo com a IT definida pelo SPC.

Relativamente à Hematologia, deixar ficar avaliam-se 2 níveis de controlo por dia, alternando entre o normal, alto e baixo. No equipamento da velocidade de sedimentação (VS) faz-se uma passagem de controlo semanal. No que concerne ao equipamento da coagulação, passam-se 2 níveis de controlo diariamente. Em relação aos parâmetros de coagulação especial (Tempo de Trombina, doseamento da Antitrombina III, fator VIII, Fator vonWillebrand, Proteínas S e C funcional, Anticoagulante Lúpico) estes têm controlos próprios, que são preparados no dia e de acordo com diferentes especificações. No Anexo I, Tabela I encontra-se descrito o plano para o CQI para este setor.

Existem vários momentos em que é necessário processar um CQI, além do que está estipulado na rotina diária do laboratório, são exemplos desses momentos:

- ✓ Após uma calibração ou recalibração;
- ✓ Após uma manutenção específica;
- ✓ Após procedimentos de rápida resolução de um problema no equipamento;
- ✓ Sempre que se utiliza um novo reagente;
- ✓ Quando se verifica que pode haver tendências nos resultados;
- ✓ Sempre que se achar necessário.

A existência de uma transmissão bidirecional faz com que os resultados sejam transmitidos diretamente para o *Modulab* e registados em cartas de Levey-Jennings. Diariamente estas cartas são analisadas tendo por base as Regras de Westgard. Os critérios de aceitação ou de não aceitação dos resultados são estabelecidos pelo responsável da Qualidade do Laboratório.

Sempre que se verifica a violação de uma regra de CQ ou uma tendência, os resultados das análises podem estar sujeitos à presença de erros clinicamente significativos e, nesta altura, as amostras devem ser novamente examinadas – após, claro, correção do erro. Pode ser necessário recalibrar, colocar um novo reagente ou executar manutenções. Qualquer ação, preventiva ou corretiva, carece de registo.

Validar os resultados dos controlos bem como verificar se está tudo operacional é obrigatório antes de se iniciar o processamento das amostras.

Relativamente ao setor da Microbiologia, o CQI recorre à manipulação e conservação de estirpes bacterianas ATCC (do inglês *American Type Culture Collection*) para controlo do Vitek[®]2, controlo estéril das placas, controlo estéril dos reagentes, e controlo da solução salina.

A utilização de estirpes ATCC, que têm características fenotípicas previamente conhecidas, permite avaliar os procedimentos utilizados para a realização dos testes de identificação (ID) e de suscetibilidade aos antimicrobianos em equipamentos automatizados, e instituir medidas corretivas, caso sejam detetados erros ⁽⁸⁾.

As culturas de trabalho são culturas preparadas a partir de culturas de armazenamento, ou a partir da cultura original, e destinam-se à utilização posterior para fins de CQI, ou outros. Deste modo, às segundas, terças ou quartas-feiras são os dias em que a cultura de trabalho pode ser preparada – consultar Anexo II, A. Uma vez por semana realiza-se o controlo (uma estirpe diferente por semana), em que se efetua a sua identificação bem como o TSA - Anexo II, B.

Sempre que se verifica um resultado não conforme, a causa de erro é procurada e corrigida, quando possível. Quando tal sucede, os testes devem repetir-se na semana seguinte, independentemente do que está previsto para essa semana. Toda e qualquer ação corretiva tem de ficar registada.

Relativamente ao controlo das placas de meios de cultura, estas têm de ser estéreis e apresentar boas condições de conservação que permitam o crescimento microbiológico das amostras dos utentes, sem interferências. Este controlo é feito através da incubação das placas não inoculadas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48h. Proceder-se assim sempre que um novo lote é aberto, e os resultados são registados às 24 e às 48h. Já a solução salina é controlada a partir da sua inoculação numa gelose COS (Gelose de Sangue Colombiana), incubada a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48h.

6.2. Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)

Entende-se por Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) a avaliação, por uma entidade ou organismo exterior, idóneo, da qualidade dos resultados fornecidos pelo laboratório, mediante análise cega de amostras disponibilizadas pelo promotor externo do programa de AEQ ⁽⁵⁾.

A AEQ permite que haja a melhoria nos níveis de desempenho do laboratório, permite comparar resultados com outros laboratórios, e todos estes fatores fazem com que haja uma uniformidade e credibilidade do trabalho realizado. Sempre que um resultado não cumpre os critérios de desempenho, que estão pré-estabelecidos, é necessário implementar ações corretivas.

Quando se fala em AEQ fala-se em exatidão – proximidade, em termos de localização (média), dos resultados analíticos em relação ao verdadeiro valor; é a propriedade do método analítico de fornecer resultados do analito próximos do seu valor real na amostra; é afetada pelo erro sistemático ⁽⁴⁾.

No SPC, a grande maioria dos parâmetros está sujeita a AEQ, o que permite aferir a exatidão dos resultados obtidos e verificar tendências nos sistemas analíticos. O envio das amostras é feito com uma periodicidade adequada, de modo a que seja possível, em tempo útil, efetuarem-se as eventuais correções aos desvios observados.

O DS em conjunto com o responsável da qualidade do SPC e o responsável do setor, avaliam o resultado da AEQ.

A AEQ pode ser mensal, trimestral ou semestral e existe em todos os setores.

O SPC participa em vários programas de CQE, que podem ser consultados no Anexo 3, Tabela III.

Atividade Desenvolvidas

I. Química Clínica

O setor de Química Clínica funciona juntamente com o de Imunologia e, como tal, é designado como “Imunoquímica”. Encontra-se sob a responsabilidade da Dra. Eduarda Campos, Técnica Superior de Saúde.

A Química Clínica é uma área multidisciplinar cujo objetivo passa pela determinação de variados parâmetros bioquímicos que auxiliam o diagnóstico, prognóstico, tratamento e monitorização da doença bem como têm um papel importante na vigilância da saúde nos cuidados de saúde primários. Estas análises avaliam as funções orgânicas do ser humano e encontram-se organizadas por órgãos e sistemas, nomeadamente, a função renal, cardíaca, hepática, gástrica, pancreática e intestinal, estudo das dislipidémias, diabetes, proteínas plasmáticas, análises da urina, entre outras funções e patologias.

O termo imunoquímica diz respeito à determinação de parâmetros bioquímicos através de métodos imunológicos, por exemplo, através da quimioluminescência.

A grande maioria das amostras enviadas para o setor da Química Clínica são de sangue total. Estas amostras são colhidas em tubos, sem anticoagulante, contendo esferas de sílica procoagulantes, de modo a promover a ativação da cascata da coagulação e, assim, após centrifugação (3500rpm, 10 minutos), se obter o soro sanguíneo. O soro é o fluido biológico mais usado neste setor e serve para determinar variadíssimos parâmetros bioquímicos, tais como iões, enzimas, proteínas. Aqui também chegam amostras de urina pontual, urina de 24h, outros líquidos biológicos (ascítico, pericárdico, pleural e sinovial) e LCR. Os líquidos biológicos são previamente homogeneizados e centrifugados antes de serem processados. Por exemplo, a urina pontual, de 24h e os líquidos são centrifugados a 2500rpm-5min, de modo a não haver destruição celular, processando-se apenas o sobrenadante.

No Anexo 4, Tabela IV, encontram-se discriminados os parâmetros bioquímicos, pesquisados no SPC, por equipamento e método.

II. Imunologia

O sistema imunitário é um sistema de defesa do organismo extraordinariamente versátil, que tem evoluído para proteger os animais de microrganismos (MO) patogénicos e de doenças como o cancro. O sistema imunitário tem a capacidade de gerar várias células e moléculas capazes de reconhecer e eliminar especificamente uma variedade, aparentemente ilimitada, de invasores. Funcionalmente, uma resposta imunitária pode ser dividida em duas

atividades relacionadas entre si - reconhecimento e resposta. O reconhecimento, por parte do sistema imunitário, é notável pela sua especificidade. Este sistema é capaz de reconhecer diferenças químicas subtis, distinguindo um agente patogénico de outro. Além disso, o sistema é capaz de discriminar as moléculas estranhas das suas próprias células e proteínas. Assim que uma molécula, estranha ao organismo, é reconhecida o sistema imunitário recruta uma variedade de células e moléculas de modo a dar uma resposta efetiva na eliminação ou neutralização do organismo invasor. Desta forma, o sistema é capaz de converter o reconhecimento inicial numa resposta efetora capaz de eliminar um determinado tipo de agente patogénico. Numa exposição posterior ao mesmo organismo estranho, o sistema imunitário, induz uma resposta de memória, caracterizada por ser rápida e intensa, para eliminar o agente patogénico e prevenir a doença ⁽⁹⁾.

O setor de Imunologia é também bastante automatizado, sendo a maior parte das determinações efetuada em equipamentos automatizados, contudo, existem alguns parâmetros realizados por técnicas de serologia manual. No Anexo 5, na Tabela V estão exemplos dessas técnicas bem como a patologia associada, realizadas no SPC.

Os produtos biológicos mais comuns neste setor são o soro, o plasma e urina (pontual ou de 24h). Para se obter o soro, é feita uma colheita de sangue venoso para um tubo sem anticoagulante. O plasma, é obtido através de uma colheita de sangue para tubos contendo K₃-EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), este é um anticoagulante que inibe a cascata da coagulação, não havendo formação de coágulo e, assim, após centrifugação, obtém-se o plasma. Contudo, existem compostos que são instáveis à temperatura ambiente e que requerem um tratamento diferente, nomeadamente a ACTH, que é doseada a partir do plasma e colhida a frio (material de colheita todo no frio), centrifugado a frio e o plasma congelado para posterior determinação. Já as crioglobulinas precisam de um tratamento a “quente”, ou seja, material de colheita na estufa e para se obter o soro é feita uma centrifugação a 37°C.

Por último, é ainda neste setor que se realizam proteinogramas e as imunofixações (soro ou urina). Num proteinograma, eletroforese das proteínas séricas, detetam-se possíveis anomalias no perfil proteico. Nas imunofixações o objetivo passa por separar e caracterizar os diferentes tipos de imunoglobulinas (incluindo cadeias leves – kappa e lambda – e pesadas – IgG, A, M, D e E) e saber se está a haver secreção de alguma imunoglobulina monoclonal, por parte dos plasmócitos. Estas técnicas auxiliam não só na orientação do diagnóstico, bem como na monitorização dos doentes com mieloma múltiplo, gamopatias monoclonais de significado indeterminado (MGUS), macroglobulinemia de *Waldenström* ⁽¹⁰⁾.

Por tudo isto, percebemos a importância deste setor na quantificação de anticorpos (Ac), autoanticorpos, marcadores tumorais séricos, hormonas, proteínas, e de alguns fármacos.

Para que seja possível dosar os parâmetros acima referidos, recorre-se a diversas metodologias analíticas, efetuadas em equipamentos automatizados, que irei abordar de seguida. No Anexo 6, Tabela VI encontram-se todos os parâmetros pesquisados no SPC – Imunologia, por equipamento e metodologia.

Autoimunidade

A autoimunidade resulta da falência da autotolerância. A tolerância aos autoantígenos é uma propriedade fundamental presente num sistema imunitário normal. Quando há falha na autotolerância surgem as reações imunológicas contra os antígenos do próprio (autoantígenos, ou antígenos autólogos). Estas reações são conhecidas pelo nome de “**autoimunidade**”, e as doenças causadas pelas mesmas são denominadas de doenças autoimunes ⁽¹¹⁾.

Estas doenças tem sido alvo de vários e aprofundados estudos, sendo um tema em constante atualização. Para o desenvolvimento da autoimunidade contribuem os seguintes fatores: a suscetibilidade genética (componente genética muito forte) e os *triggers* ambientais (dieta, fármacos, toxinas, infeções e lesões locais nos tecidos) ⁽¹¹⁾. A Figura 2, representa esses mesmos fatores, juntamente com a óbvia regulação imunitária ou a falha desta, que nos permite perceber que para o desenvolvimento das doenças autoimunes é preciso que um conjunto de fatores atue em simultâneo.

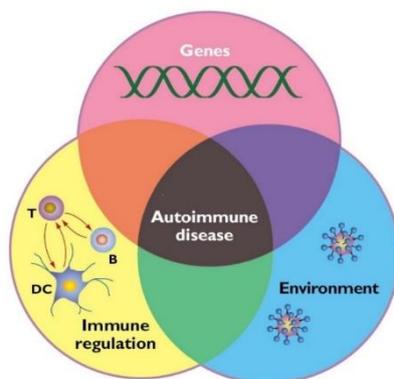


Figura &- Fatores que contribuem para autoimunidade ⁽¹²⁾.

Fonte - <http://www.doencasdofigado.com.br/Autoimunidade.pdf>

As doenças autoimunes podem ser divididas em duas amplas categorias: doenças autoimunes sistêmicas, e específicas de órgão. Estima-se que estas doenças afetem 5% a 7% da população humana, muitas vezes causando doenças crônicas debilitantes ⁽⁹⁾.

Nas doenças autoimunes sistêmicas, a resposta é direcionada contra uma vasta gama de antígenos alvo, envolvendo uma série de órgãos e tecidos. Surgindo o aparecimento dos autoanticorpos contra componentes celulares, presentes em todo o organismo. Estas doenças

refletem um defeito geral na regulação imunológica, resultando em células T e B hiperativas. O dano no tecido é generalizado, seja por respostas imunológicas mediadas por células, quer por dano celular direto causado por autoanticorpos ou pela acumulação de imunocomplexos ⁽⁹⁾. Exemplos destas doenças e os seus Ags (Ags Self), encontram-se em Anexo 7, Tabela VII.

Nas doenças autoimunes específicas de órgão, a resposta imunitária é direcionada a um Ag alvo único de um único órgão ou glândula, ficando grande parte das manifestações limitadas a esse órgão. As células do órgão-alvo podem ser danificadas diretamente por resposta humoral ou por mecanismos efetores mediados por células. Em alternativa, os Ac podem estimular ou bloquear a função normal do órgão alvo ⁽⁹⁾. Exemplos destas doenças autoimunes, encontram-se no Anexo 8, Tabela VIII.

Para que seja possível fazer-se o estudo/diagnóstico destas doenças é fulcral a pesquisa e a identificação dos anticorpos antinucleares (ANA) e anticitoplasmáticos. Esta pesquisa tem sido feita por IFI, pois é a técnica de referência. Contudo, devido à necessidade crescente da se efetuar pesquisa de ANA surgiram evoluções técnicas, surgindo novos meios de diagnóstico, tais como: ELISA, quimioluminescência, ensaios fluoroenzimáticos e *immunoblotting*.

No SPC, o estudo da autoimunidade faz-se com o apoio dos métodos de IFI, ELISA, e *immunoblotting*, de acordo com o que é pedido em cada caso. De realçar apenas que, devido ao elevado custo destes testes, o serviço organiza-se de modo a reunir um número de amostras que justifique a realização do mesmo. O tempo de resposta nesta área é, por isso, mais alargado, não só pelo já mencionado, mas também porque muitas vezes são precisos testes confirmatórios ou doseamentos específicos.

III. Hematologia

O setor de Hematologia encontra-se sob a responsabilidade do Dr. Moshen Rostami, Assistente Hospitalar de Patologia Clínica e da Dra. Sandra Monteiro, TSS especialista em Análises Clínicas.

Neste setor fiz parte da rotina laboratorial, preparando as amostras para serem colocadas nos equipamentos, preparação, coloração e observação de esfregaços de sangue para contagem celular e a sua morfologia, testes de avaliação da hemostase e, neste contexto, assisti à consulta de HCO, realizada pelos Médicos Patologistas do Serviço, uma vez por semana em cada unidade – à 2ª feira na Unidade Abrantes, à 4ª feira na Unidade de Torres Novas e à 5ª feira na Unidade Tomar.

A Hematologia estuda o sangue – tecido fluido, formado por uma porção celular que circula em suspensão num meio líquido, o plasma ⁽¹³⁾. Este estudo incide sobretudo nas células sanguíneas – eritrócitos (ou glóbulos vermelhos), leucócitos (ou glóbulos brancos) e plaquetas, e na coagulação sanguínea. Para a realização deste estudo surgiu a necessidade de haver um exame que avaliasse quantitativa e qualitativamente os elementos celulares do sangue – o hemograma. O hemograma é o exame complementar mais requisitado quer em consultas quer em internamentos ⁽¹⁴⁾. De seguida, irei abordar de forma sucinta, todos os elementos que constituem um hemograma.

Hemograma

O hemograma é a análise de rotina mais pedida no SPC, cerca de 6150 hemogramas/mês. É de fácil execução, não requerendo muita manipulação por parte do operador, contudo esta simplicidade de execução esconde uma análise complexa, envolvendo 26 parâmetros a que se pode somar ainda a contagem de eritroblastos e reticulócitos, quando necessário. Deste modo, fazem parte do hemograma os seguintes elementos:

- ✓ **Eritrograma** – parâmetro do hemograma que avalia os elementos da série eritrocitária e permite obter o Hematócrito (HTC), a concentração de hemoglobina (Hb), a contagem de eritrócitos, o Volume Corpuscular Médio (VCM), a Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), a Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) e o Coeficiente de Dispersão Eritrocitária (RDW – *Cell Distribution Width*);
- ✓ **Leucograma** – parâmetro que avalia os leucócitos, através deste obtém-se a contagem total de leucócitos (WBC, *White Blood Cells*) e a Fórmula leucocitária.
- ✓ **Plaquetograma** – estudo das plaquetas, este parâmetro fornece a contagem de plaquetas, o Plaquetócrito, o Volume Plaquetar Médio (VPM) e o Coeficiente de Dispersão Plaquetar (PDW – *Platelet Distribution Width*).

Para a realização de um hemograma, a amostra utilizada é a de sangue total. Esta amostra obtém-se colhendo sangue venoso em tubos contendo K₃-EDTA, um anticoagulante que funciona como um agente quelante dos iões Cálcio (Ca²⁺) que inibe, assim, o processo de coagulação. A amostra é colocada num agitador antes de ser inserida no equipamento – Sysmex XN-1000™. É um analisador hematológico compacto de alta performance que fornece informação quantitativa, faz avaliação qualitativa das 3 séries e ainda emite alertas para

determinadas anomalias. Colocando a amostra no equipamento, parte desta é aspirada para diferentes canais, onde são aplicados diferentes princípios de funcionamento de modo a obter os diferentes parâmetros.

De uma forma breve, descreverei os diferentes parâmetros de um hemograma bem como a metodologia utilizada em cada parâmetro, compilada no Anexo 9, tabela IX resumo.

Eritrograma

Contagem de Eritrócitos (RBC, Red Blood Cells) e Plaquetas (PLT)

Canal: RBC/PLT

Método: Focagem hidrodinâmica com detecção por impedância elétrica.

O canal RBC/PLT conta os eritrócitos e as plaquetas a partir de uma corrente de partículas, que passam por uma abertura específica (célula de contagem), sujeita a uma corrente contínua. À medida que cada célula do sangue, suspensa no líquido condutor, passa pelo centro dessa abertura, gera-se um impulso que se traduz numa alteração da condutividade elétrica. O nº de impulsos diz respeito ao número de partículas/células e a amplitude (intensidade) ao volume das mesmas. Os dados obtidos neste processo são convertidos em histogramas. A separação das 2 populações celulares é efetuada com discriminadores móveis presentes no equipamento ⁽¹⁵⁾.

Para os RBC, o resultado é expresso em $nx10^{12}$ células por L.

Para as PLT, o resultado é expresso em $nx10^9$ células por L.

Hematócrito - HTC

O hematócrito representa o volume ocupado pelos eritrócitos num determinado volume de sangue. Calcula-se através da fórmula ⁽¹⁴⁾:

$$\text{HCT (\%)} = (\text{RBC}) \times (\text{VCM}) / 10$$

O HCT nos analisadores Sysmex XN-1000TM é obtido pelo método da soma da altura dos impulsos dos eritrócitos num volume fixo ⁽¹⁵⁾.

Valor de referência: 35 – 47%

Hemoglobina (Hb)

Canal: HGB

Método: Lauril Sulfato de Sódio (SLS, do inglês *Sodium Lauryl Sulfate*) sem cianeto

Neste método, a amostra contata com o SLS sem cianeto. O SLS é um reagente que hemolisa os eritrócitos e leucócitos da amostra. Os grupos hidrofóbicos do SLS vão atuar na molécula da globina, modificando a sua conformação. Verifica-se a oxidação do grupo heme $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$. Os grupos hidrofílicos da molécula do SLS ligam-se ao Fe^{3+} , formando um produto de reação corado e estável que é analisado fotometricamente a 555nm.

SLS sem cianeto não é o método de referência para a medição da concentração de Hb recomendado pelo *International Committee for Standardization in Haematology* (ICSH), este recomenda o método da cianometahemoglobina (método de referência). Contudo, o método utilizado pelo equipamento Sysmex XN-1000™ apresenta uma boa correlação com o método de referência ⁽¹⁵⁾.

Valor de referência: Sexo masculino (♂): 13 – 17 g/dL; Sexo feminino (♀): 12 – 15 g/dL

A determinação do valor de Hb é importante dado que esta desempenha uma função fundamental no organismo: é responsável pelas trocas gasosas que ocorrem entre o eritrócito e os tecidos ou os pulmões. A principal função dos eritrócitos é o transporte de oxigénio para os tecidos e o retorno do dióxido de carbono dos tecidos para os pulmões, esta troca é executada por uma proteína especializada – a hemoglobina ⁽¹⁶⁾.

A patologia mais frequentemente associada à Hb é a anemia. Define-se anemia como a diminuição da concentração de Hb abaixo dos valores de referência para a idade e para o sexo ⁽¹⁶⁾.

As anemias são desencadeadas por vários fatores e são classificadas segundo 2 critérios – morfológico e cinético ou fisiopatológico. O critério morfológico não permite determinar a causa da anemia, apenas se obtém a informação do aspeto morfológico dos eritrócitos presentes na circulação sanguínea. Segundo este critério, as anemias podem ser Macrocíticas, Microcíticas, ou Normocíticas – referindo-se ao tamanho do eritrócito. O critério cinético da classificação das anemias fornece a base fisiopatológica para se conseguir explicar os diferentes tipos ⁽¹³⁾.

A deficiência de ferro é a causa mais comum de anemia em todos os países do Mundo; porém existem outras causas que se encontram no quadro resumo, sobre a classificação dos diferentes tipos de anemia, abaixo no Quadro A:

Microcítica, hipocrômica	Normocítica, normocrômica	Macrocítica
VCM < 80 fL HCM < 27 pg	VCM = 80-95 fL HCM < 27 pg	VCM > 95 fL
Deficiência de ferro (Ferropénica). Talassemias. Anemia da doença crónica. Intoxicação por chumbo. Anemia sideroblástica.	Anemias hemolíticas. Anemia da doença crónica. Anemia pós-hemorrágica aguda. Nefropatias. Deficiências mistas. Insuficiência da medula óssea (pós-quimioterapia, por exemplo)	Anemia megaloblástica: deficiência de vitamina B12. Não megaloblástica: alcoolismo, hepatopatias mielodisplasias.

Quadro A - Classificação dos diferentes tipos de anemias ⁽¹⁶⁾.

Contagem diferencial de WBC

Canal: WDF (para WBC)

Método: Citometria de fluxo de fluorescência (FFC - fluorescence flow cytometry)

Os eritrócitos são lisados pelo surfactante e as membranas dos leucócitos são perfuradas com poros ultramicroscópicos através dos quais um marcador fluorescente migra, indo ligar-se aos ácidos nucleicos, seguindo-se a análise por citometria de fluxo com fluorescência.

Sobre as células incide feixe de laser semiconductor (a 633nm) cuja dispersão em diferentes direções permite discriminar as células:

- Dispersão frontal de luz (forward scatter – FSC): a intensidade desta indica o volume celular;
- Dispersão lateral de luz (side scatter – SSC): fornece informação sobre o conteúdo celular (como por exemplo: núcleos e grânulos);
- Fluorescência lateral (side fluorescence – SFL): indica a quantidade de ADN e ARN (ácido ribonucleico) presente na célula.

Os resultados são apresentados em diagramas de dispersão (Figura 3), conseguindo discriminar os diferentes agrupamentos celulares ⁽¹⁵⁾.

WDF scattergram

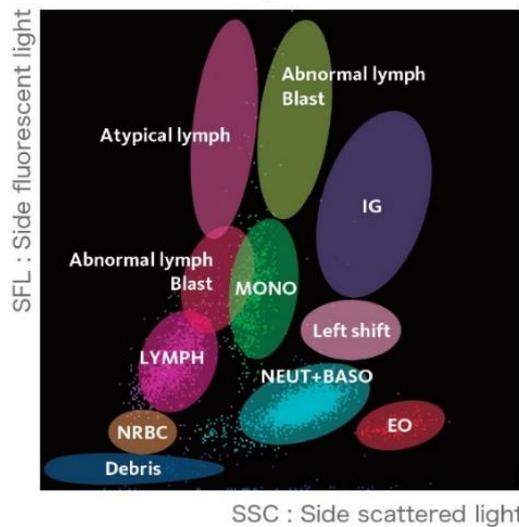


Figura 1 - Diagrama de dispersão dos leucócitos. (SFL/SSC) ⁽¹⁵⁾.

Fonte: MATSUSHITA, Hiromichi et al. - **Clinical Case Report**. Sysmex, XN-Series - Automotated Hematology Analyser. Volume 1. Kobe, Japan. 2016.

Contagem total de Reticulócitos

Canal: RET

Método: Citometria de fluxo com fluorescência

Um reagente de lise, inicialmente, perfura ligeiramente as membranas celulares, deixando as células intactas. Numa segunda etapa, os ácidos nucleicos são marcados pela fluorescência do corante e o sinal emitido é diretamente proporcional à quantidade de ácidos nucleicos dos leucócitos, eritroblastos e reticulócitos. Os reticulócitos emitem um sinal maior de fluorescência que os eritrócitos (pois estes não têm ARN) mas menor sinal em relação aos leucócitos. Dado que o conteúdo em ARN vai diminuindo ao longo do processo de maturação dos reticulócitos é assim possível determinar três parâmetros que refletem esses estados de maturação (reticulócitos de baixa, média e alta fluorescência).

Valor de referência: 0,5 – 1,5%

Índices hematimétricos, VCM, HCM e CHCM:

Volume Corpuscular Médio – VCM

Volume corpuscular médio é o volume médio de um eritrócito ⁽¹⁴⁾, e obtém-se a partir da seguinte fórmula:

$$\text{VCM} = (\text{HTC} / \text{RBC}) \times 10$$

Valor de referência: 85 – 95 fL

Hemoglobina Corpuscular Média – HCM

Este parâmetro diz respeito à quantidade média de Hb contida em cada eritrócito ⁽¹⁴⁾.
Obtém-se a partir de:

$$\text{HCM} = (\text{Hb/RBC}) \times 10$$

Valor de referência: 27 – 32 pg

Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média – CHCM

É uma estimativa da concentração média de Hb presente nos eritrócitos ⁽¹⁴⁾. Calcula-se a partir de:

$$\text{CHCM} = \text{Hb/HCT} \times 100$$

Valor de referência: 32 – 36 g/dL

Os valores de referência para os parâmetros acima referidos, encontram-se descritos no Anexo 10, Tabela X.

Esfregaço de sangue periférico e coloração May-Grünwald-Giemsa

A pedido do médico requisitante ou quando o hemograma apresenta alterações significativas, surgindo um alerta no equipamento, é efetuado um esfregaço de sangue periférico (ESP).

Um ESP é efetuado a partir de sangue periférico colhido em tubo K₃-EDTA, sobre uma lâmina de vidro, executado pela técnica representada na Figura 4, ficando assim disponível para posterior observação uma fina camada de células. Depois de seca, a lâmina é corada, com recurso a equipamento automatizado (RAL Stainer), segundo a coloração de May-Grünwald-Giemsa. Esta coloração permite a visualização, de forma pormenorizada, das características celulares, a evidenciação de material extracelular, e a visualização de microrganismos (MO) ⁽¹⁷⁾. De forma automatizada, os ESP são fixados pelo metanol. O azul de metileno (corante básico) cora o núcleo e os componentes citoplasmáticos ácidos, corando as granulações basófilas bem como os núcleos das células, de azul e roxo. A eosina (corante ácido) vai corar os componentes citoplasmáticos básicos: citoplasma celular e as granulações dos eosinófilos (acidófilas), ficando estas estruturas em tons de rosa-alaranjado.

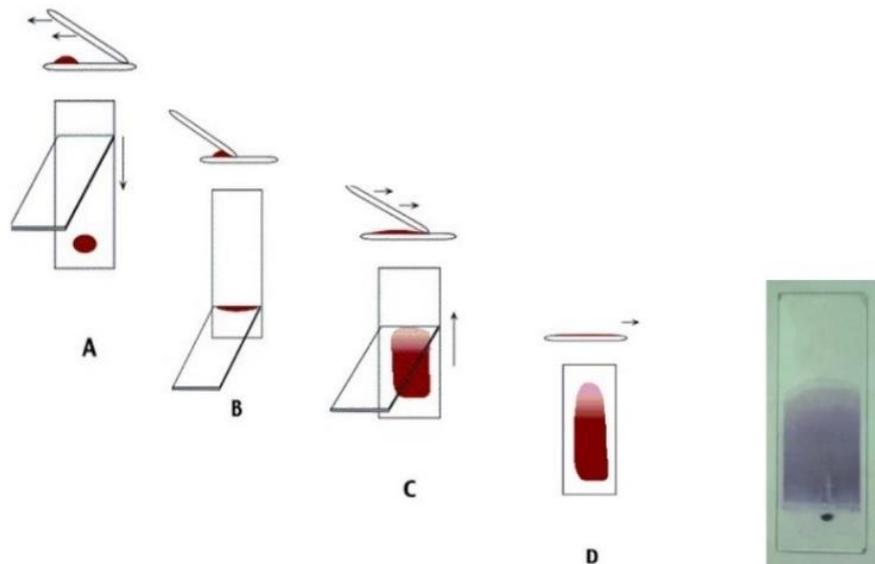


Figura (- Execução de ESP ⁽¹⁸⁾.

Fonte: <https://document.onl/documents/esfregaco-sanguineo-e-coloracao-universidade-o-sanguineo-e-coloracao-prof.html>

Legenda: A – Depositar uma gota de sangue na extremidade de uma lâmina I
 B – Segurar uma lâmina 2 ou lamela e deslocá-la até a gota. A lâmina 2 deve estar apoiada sempre na lâmina 1 e o ângulo formado entre lâminas deve ser de 30° a 45°. Deixar que a gota se difunda ao longo da lâmina 2.
 C e D – Com um gesto uniforme, deslizar a lâmina 2 sobre a lâmina 1 até à extremidade até que o sangue se esgote.
 Deixar secar o ESP. Garantir que a lâmina está identificada com o nº do processo e data.

O ESP no fim de corado é observado no microscópio ótico. Primeiro com a objetiva de baixa ampliação (10x) para verificar a qualidade da preparação, bem como a distribuição celular. De seguida, com a objetiva de maior ampliação (100x), com recurso a óleo de imersão, observar a morfologia das 3 séries: eritrocitária, leucocitária e plaquetar. Para a obtenção correta da fórmula leucocitária devem contar-se 200 leucócitos na objetiva de 100x. De notar que esta contagem deve ser feita numa zona do ESP onde as células se encontrem individualizadas, evitar o início e a franja do ESP.

Alterações das series Eritrocitária, Leucocitária e Plaquetar

I. Série Eritrocitária ou Vermelha

Existem diversas alterações que se podem observar na série Eritrocitária, nomeadamente:

- **Anisocitose**, que se caracteriza por existirem vários tamanhos de eritrócitos.

- **Poiquilocitose**, caracteriza-se pela presença de eritrócitos de diferentes formas, por exemplo: esferócitos, eliptócitos, estomatócitos, células em alvo ou *target cells*, acantócitos, equinócitos, dacriócitos ou células em gota ou lágrima, esquizócitos e queratócitos.

- **Anisocromia** é a variação da cor do eritrócito devido às diferentes concentrações de Hb. O eritrócito pode apresentar hipocromia ou policromasia.

- **Inclusões eritrocitárias** são inclusões presentes nos eritrócitos que se podem observar no ESP, por exemplo: pontuado basófilo, corpos de Howell-Jolly, anel de Cabot, corpos de Heinz ^(14; 19).

É ainda possível, em determinadas situações, que haja alteração na distribuição dos eritrócitos, como os *roleaux* ou aglutinação.

2. Série Leucocitária ou Branca

Leucócitos totais (Valor de referência: $4-10 \times 10^9/L$)

Devem observar-se possíveis alterações na morfologia, no grau de maturação (aspecto da cromatina/citoplasma, presença de blastos – precursores imaturos), inclusões citoplasmáticas, e alterações quantitativas na série branca. De seguida, de forma breve, estão descritas as alterações quantitativas (diminuição e aumento dos glóbulos brancos), bem como possíveis causas que possam estar na base dessas alterações.

✓ **Neutrófilos (45-70%)**

- Neutropenia quando o valor de neutrófilos é $< 1,5 \times 10^9/L$. Esta diminuição pode estar associada: a fármacos, ao alcoolismo, a doenças como anemia megaloblástica, hemoglobinúria paroxística noturna, hiperesplenismo e hemato-oncológica. Pode ainda ser de causa imune, ita ou devido a aplasia medular ^(16;20).

- Neutrofilia quando o valor de neutrófilos é $> 7 \times 10^9/L$. O aumento do nº de neutrófilos verifica-se na infeção bacteriana, nas respostas inflamatórias, nas síndromes mieloproliferativas, nos tratamentos com corticosteroides, nos últimos meses de gravidez, nas pessoas com hábitos tabágicos, em intoxicações entre outros. A neutrofilia também pode ser hereditária ^(16;20).

✓ **Eosinófilos (1-5%)**

- Eosinofilia, quando se verifica a presença de eosinófilos ($> 0,4 \times 10^9/L$). A eosinofilia ocorre nas alergias, na síndrome hipereosinofílica idiopática, na hipersensibilidade medicamentosa, na infeção parasitária, na doença linfoproliferativa, nas síndromes mieloproliferativas, nas doenças autoimunes ^(16; 20).

✓ **Basófilos (<1%)**

- Basofilia, quando a presença de basófilos é $> 0,1 \times 10^9/L$. Ocorre em síndromes mieloproliferativas, leucemia mieloide crônica ^(16; 20).

✓ **Linfócitos (20-40%)**

- Linfopénia, quando o número de linfócitos é $< 1 \times 10^9/L$. Terapêutica com corticosteroides, imunodeficiências, são exemplos em que se pode verificar linfopenia.

- Linfocitose, quando há linfócitos $> 3,71 \times 10^9/L$. Pode observar-se linfocitose na mononucleose infecciosa, LES, toxoplasmose, doenças autoimunes, leucemia linfocítica aguda e crônica, macroglobulinemia (distúrbio maligno dos plasmócitos) de Waldenström ^(16; 20).

✓ **Monócitos (2-10%)**

- Monocitopénia, presença de monócitos $< 0,2 \times 10^9/L$. Na leucemia a “*hairy cells*” e na terapêutica com glucocorticóides pode encontrar-se monocitopénia ^(16; 20).

- Monocitose, quando os monócitos estão $> 0,7 \times 10^9/L$. A monocitose pode estar presente n tuberculose, malária, febre tifoide, endocardite bacteriana, doenças inflamatórias, linfoma de Hodgkin, leucemias mielomonocítica e monocítica, síndromes mielodisplásicas ^(16; 20).

3. Série Plaquetar

Observa-se a morfologia das plaquetas: anisocitose plaquetar (variação do tamanho), plaquetas gigantes; granulações; distribuição – agregados, satelitismo. Quanto às alterações quantitativas, estas podem ser:

- Trombocitopenias, quando se verifica que o número total de plaquetas se encontra com um valor $< 150 \times 10^9/L$. Esta situação pode ter várias causas, tais como: coagulação intravascular disseminada, infeções virais, malária, trombocitopenia gestacional, presença de autoanticorpos, síndrome hemolítica urémica ^(16; 20).

- Trombocitose quando se verifica um valor total de plaquetas $> 400 \times 10^9/L$. Verifica-se esta situação em processos inflamatórios agudos, após hemorragias, distúrbios mieloproliferativos ^(16; 20).

Velocidade de Sedimentação eritrocitária (VS)

Consiste na medida, em milímetros, da sedimentação dos eritrócitos numa coluna padrão após 60 minutos (1 hora), ou seja, mede a velocidade com que os eritrócitos

sedimentam no período de uma hora – método de referência Westergren – o resultado é expresso em mm/h ^(21; 22). É um parâmetro não específico que se altera na presença de processos inflamatórios, infecciosos ou neoplásicos ⁽²³⁾.

Num processo inflamatório, altas concentrações de proteínas de fase aguda estão presentes com aumento da agregação dos eritrócitos e formação dos *rouleaux*, o que se traduz num aumento da massa celular e da VS ^(21; 23). As patologias que interferem com a forma dos eritrócitos levam a uma diminuição da VS, pois interferem com a formação dos *rouleaux*.

- Diminuição da VS: insuficiência hepática e cardíaca, hipofibrinogênemia e o uso de anti-inflamatórios ⁽²³⁾.

- Aumento da VS: anemia, policitemia (aumento do nº de eritrócitos), neoplasias malignas, nos recém-nascidos ⁽²³⁾.

No SPC a medição da VS é realizada no equipamento automatizado Alifax Test I THL (utilizando sangue total colhido em tubo de K₃-EDTA) pelo método de fotometria capilar de fluxo. Os valores obtidos são convertidos para valores comparados ao método de referência ⁽²⁵⁾.

Valor de referência: 0 – 20 mm/h.

Hemostase

A hemostase é um processo fisiológico que interrompe a perda de sangue no local de uma lesão, enquanto mantém o fluxo normal de sangue em outras partes da circulação. A perda de sangue é interrompida pela formação de um tampão hemostático ⁽¹⁶⁾.

A hemostase pode dividir-se em 3 fases: primária, secundária e fibrinólise ⁽²⁵⁾. Na primária, acontece a agregação plaquetária e formação do tampão plaquetar em que as plaquetas são ativadas num processo multifacetado ^(16; 25). As plaquetas requerem interações específicas plaqueta-parede vascular (adesão) e plaqueta-plaqueta (agregação), parcialmente mediadas pelo Fator de *von Willebrand* (FvW) e, como resultado, aderem ao local da lesão e umas às outras, obstruindo a lesão. A secundária refere-se à deposição de fibrina insolúvel, que é gerada pela cascata de coagulação proteolítica. A fibrina vai infiltrar os agregados de plaquetas, nos locais de lesão vascular, convertendo os tampões primários e instáveis de plaquetas em tampões hemostáticos firmes e estáveis. Esses dois processos acontecem simultaneamente e estão mecanicamente interligados. A fibrinólise consiste na degradação da fibrina, pela plasmina, em produtos solúveis. O equilíbrio adequado entre os sistemas pró-coagulantes e os sistemas anticoagulantes é fundamental para a hemostase ⁽²⁵⁾.

Cascata da Coagulação

A cascata da coagulação (Figura 5) é um processo complexo que envolve um sistema de amplificação biológica, no qual, poucas substâncias de iniciação ativam em sequência, por proteólise, uma cascata de proteínas precursoras circulantes – enzimas, denominadas “fatores de coagulação” – que culmina na formação/produção de trombina. A trombina vai, por sua vez, converter o fibrinogênio solúvel do plasma em fibrina ⁽¹⁶⁾.

A cascata tem 2 vias: **extrínseca** que envolve elementos do sangue que, por norma, não estão presentes no espaço intravascular e uma **intrínseca**, que é iniciada por componentes presentes no espaço intravascular, que convergem para uma via comum, a partir do fator X (FX) ⁽²⁶⁾.

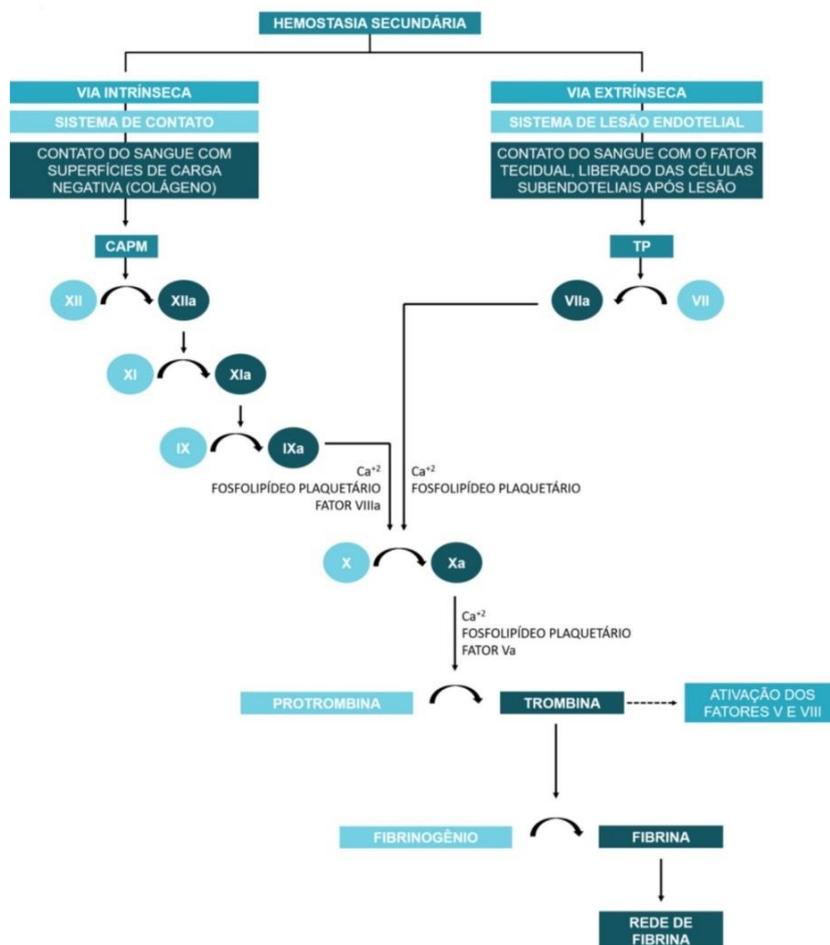


Figura) - Cascata da coagulação ⁽²⁷⁾.

Fonte: https://www.centerlab.com/blog/Centernews_107/

Legenda: - Via extrínseca: fator VII plasmático é ativado na presença de seu cofator, o fator tecidual (FT), formando o complexo fator VII ativado/FT (FVIIa/FT), responsável pela ativação do fator X.

- Via intrínseca: a ativação do fator XII ocorre quando o sangue entra em contato com uma superfície contendo cargas elétricas negativas. Este processo é denominado por "ativação por contato" e requer, ainda, a presença de outros componentes do plasma: pré-caliceína (PK - uma serinoprotease) e cininogênio de alto peso molecular (HWHK – um cofator não enzimático). O fator XII ativado ativa o fator XI que, por sua vez, ativa o fator IX. O fator IX ativado, na presença de fator VIII ativado pela trombina, e em presença de íons cálcio (complexo Xase), ativa o fator X da coagulação. Uma vez o FX ativado, desencadeia-se a geração de trombina e, subsequentemente, formação de fibrina (via comum) ⁽²⁶⁾.

Avaliação laboratorial da hemostase

O tempo de protrombina (PT) e o tempo de tromboplastina parcial ativado (aPTT), o fibrinogénio e os D-dímeros constituem parâmetros de rotina. Existem outros parâmetros, chamados de “coagulação especial”, que não são feitos todos os dias, tais como Tempo de Trombina (TT), doseamento da Antitrombina III, do fator VIII, FvW, Proteínas S livre e C funcional, e o Anticoagulante Lúpico (AL).

No SPC o equipamento disponível para o estudo da hemostase é o analisador automatizado ACL TOP 500[®] da Instrumentation Laboratory. Este equipamento utiliza o método turbidimétrico para todos os parâmetros à exceção dos D-dímeros e do Anticoagulante lúpico (AL), para estes usa o método imunoturbidimétrico. Pelo princípio da turbidimetria avalia-se o decréscimo da luz transmitida à medida que o coágulo se vai formando. No método imunoturbidimétrico há formação de um complexo Ag-Ac, que afeta a transmissão da luz pela amostra ⁽²⁸⁾.

Determinação do Tempo de Protrombina (TP)

A tromboplastina (semelhante ao fator tecidual) e o cálcio são adicionados à amostra ativando-se a via extrínseca. A tromboplastina vai ativar o fator VII, há formação do complexo que, na presença de iões cálcio, é responsável pela transformação da protrombina em trombina.

O TP avalia a atividade os fatores VII, X, V, protrombina (II), e fibrinogénio (I) – via extrínseca e comum. É utilizado para monitorizar a terapêutica anticoagulante oral (antagonistas da vitamina K).

Aumentos de TP podem surgir por várias causas: deficiência ou inibição dos fatores da via extrínseca ou da via comum (insuficiência hepática – os fatores são sintetizados no fígado, deficiência ou má absorção de vitamina K); toma de anticoagulantes orais (varfarina interfere com a atividade dos fatores II, VII, IX e X); coagulação intravascular disseminada (CIVD) ^(16, 29).

International Normalized Ratio (INR)

A terapêutica anticoagulante é monitorizada pelo valor de INR. O INR é calculado a partir do valor de TP. No sentido de haver uma padronização dos resultados deste teste, a Organização Mundial de Saúde (OMS) preconizou o uso do INR. A tromboplastina presente no reagente deste teste pode variar entre laboratórios então, de modo a reduzir influência desta variável no resultado do TP, a OMS criou o ISI (*International Sensitivity Index*) ⁽²²⁾. O ISI determina-se através da comparação de cada reagente com uma tromboplastina padrão

(preparação de referência internacional), este dado é fornecido pelos fabricantes. Então, o INR baseia-se na relação entre o TP do doente e um TP médio^{ISI} normal corrigido para a “sensibilidade” da tromboplastina em uso, uniformizando os resultados dos doentes sujeitos a terapêutica com antagonistas da vitamina K ^(16; 30). Cálculo de INR:

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{TP utente em segundos}}{\text{TP referência em segundos}} \right)$$

O valor de INR deve ser de 1 numa pessoa saudável. Em doentes sujeitos a terapêutica anticoagulante o valor deve manter-se entre 2-3. Para os doentes com prótese valvular mecânica 2,5-3,5 ^(31; 32). Assim, perante um aumento de INR – aumento no tempo de coagulação – a dose do antagonista da vitamina K é diminuída e vice-versa.

Um valor de INR aumentado pode traduzir deficiência de vitamina K ou dos fatores I, II, V, VII e X, doença hepática grave, CIVD, terapêutica com anticoagulantes, entre outros ⁽³³⁾.

Determinação do Tempo de tromboplastina Parcial Ativada (aTTP)

O aPTT indica globalmente a eficácia da via intrínseca e comum (cascata da coagulação) depois de ativados os fatores de contacto, avaliando os fatores XII, XI, IX e VIII além dos fatores da via comum, X, V, protrombina (II) e o fibrinogénio (I) e ainda a pré-caliceína e o cininogénio de alto peso molecular (HWHK). É também usado na monitorização de terapêuticas com heparina ^(16; 22). Neste teste, são adicionadas 3 substâncias ao plasma citratado: os fosfolípidos, um ativador por contacto (sílica) e cálcio, e mede-se o tempo de coagulação do plasma. Verifica-se um aumento de aPTT quando há deficiência ou inibição dos um ou mais dos seguintes fatores de coagulação: XII, XI, IX (doença de Christmas), VIII (hemofilia), X, V, protrombina (II) e fibrinogénio (I); bem como em terapêuticas com heparina e na CIVD ⁽¹⁶⁾.

Valores de Referência: 25,4 – 34,3 segundos

Determinação do Tempo de Trombina (TT) – Coagulação Especial

O TT é sensível à deficiência de fibrinogénio ou à inibição da trombina. Este parâmetro avalia a conversão do fibrinogénio a fibrina – última etapa da via comum. Acrescenta-se trombina cálcica ao plasma citratado e mede-se o tempo de coagulação do plasma. Ao acrescentar-se a trombina a conversão é feita sem que haja a ativação das vias intrínseca e extrínseca. Um aumento do TT, pode dever-se: a deficiências de fibrinogénio (quantitativa e qualitativa); à inativação da trombina pela terapêutica com heparina ou dabigatranó; à presença de produtos da degradação da fibrina (estes inibem a conversão do fibrinogénio a fibrina) ⁽²²⁾.

Valores de Referência: 11 – 16 segundos

Determinação do Fibrinogénio

O fibrinogénio ou fator I (via comum), é uma proteína de fase aguda, produzido pelos hepatócitos ⁽³⁴⁾. Esta glicoproteína está presente em grandes quantidades no plasma e é fundamental para a formação do trombo de fibrina. A conversão de fibrinogénio a fibrina, ocorre sob a ação da trombina (fator final da cascata da coagulação) ⁽²²⁾. O fibrinogénio integra um grupo de biomarcadores inflamatórios ⁽²²⁾. Verifica-se um aumento do nível de fibrinogénio nos casos de diabetes, síndromes inflamatórias e obesidade; uma diminuição de fibrinogénio é encontrada em CIVD, fibrinogenólise (remoção do excesso de fibrina - aumento do consumo) ⁽³⁵⁾.

Na rotina laboratorial a quantificação do fibrinogénio é feita pelo método de referência – Método Clauss. Neste, o tempo de coagulação do plasma é medido na presença de um excesso de trombina (diluído em proporções adequadas) e vai depender diretamente da quantidade de fibrinogénio plasmático e não da trombina. Posteriormente, o tempo de coagulação obtido é comparado com uma preparação de fibrinogénio padrão onde se verifica uma proporcionalidade inversa entre a concentração de fibrinogénio (presente na amostra) e o tempo de coagulação ⁽³⁶⁾.

Valores de Referência: 2-4 g/L

Determinação do Anticoagulante Lúpico – Coagulação Especial

O Anticoagulante Lúpico (AL) é considerado um inibidor adquirido da coagulação, pois prolonga *in vitro* os tempos de coagulação dependentes de fosfolípidos (FL), neutralizando os FL dos reagentes utilizados ⁽³⁷⁾. O AL é considerado uma “alteração” laboratorial, que está associada a uma síndrome antifosfolipídica ⁽³⁸⁾. AL, Ac antifosfolipídico, inicialmente detetado em doentes com LES (10%) e outras doenças autoimunes (que frequentemente têm Ac para outros Ag lipídicos), é identificado pelo prolongamento do aPTT ⁽¹⁶⁾. Apesar de o AL não estar associado a risco hemorrágico verifica-se o risco aumentado de trombose venosa ou arterial ⁽¹⁶⁾. Suspeita-se de AL quando há trombose, abortos recorrentes ou testes de coagulação dependentes de fosfolípidos prolongado, sem outras causas aparentes ou identificáveis; a sua presença pode ser transitória ou persistente ⁽³⁸⁾.

A pesquisa do AL é feita com recurso a reagentes que contêm FL, Ca^{2+} , inibidor de heparina, veneno da víbora de Russel (dRVVT – *Dilute Russell's Viper Venon time*), este veneno contém um potente ativador do fator X e na presença de Ca^{2+} desencadeia a coagulação,

eliminando-se assim, as interações dos fatores das vias extrínseca e intrínseca (não ocorrem) e assim ocorre a conversão do fibrinogénio a fibrina, sem ativar as vias referidas vias ⁽¹⁶⁾.

O teste de *screening* é realizado na presença de uma baixa concentração de FL e na presença de AL o tempo de coagulação é prolongado (aumenta). De seguida realiza-se o teste confirmatório, recorrendo a uma maior concentração de FL, estes neutralizam os AL presentes no plasma que se está a testar e, assim, o tempo de coagulação será menor, quando comprado ao teste de *screening* ⁽¹⁶⁾.

Valores de Referência: *Screening* – Negativo¹ ou Positivo².

Confirmação³ – razão superior a 1,2.

Nota:

¹Tempo normal: sem presença de AL – Negativo

²Tempo prolongado: presença de AL ou deficiência de fatores

³Razão tempo de *screening*/tempo de confirmação > 1,2: confirmatório da presença de AL.

Determinação dos D-dímeros

Os D-dímeros são produtos da degradação específica da fibrina (pela plasmina) e na presença de uma trombose recente a concentração destes encontra-se aumentada. Representando uma grande vantagem em relação à medição dos produtos de degradação da fibrina, dado que esses produtos são produzidos quer quando a plasmina degrada a fibrina quer quando degrada o fibrinogénio ^(16; 39). A sua determinação é útil para exclusão de tromboembolismo venoso, quando se verifica um valor inferior a 500 µg/L. Um valor aumentado de D-dímeros verifica-se CIVD, em períodos pós-operatórios, neoplasias, patologias infecciosas graves e hemorragias ⁽⁴⁰⁾. Recomenda-se a sua determinação antes de iniciar qualquer terapêutica anticoagulante.

O teste realiza-se com base nas microesferas de látex, que possuem Ac monoclonais específicos para os D-dímeros. Quando os D-dímeros estão presentes, no plasma que se está a testar, ocorre aglutinação destas microesferas aumentando a turvação da mistura reacional que depois é medida por fotometria ⁽⁴⁰⁾.

Valores de Referência: 0 – 500 µg/L

IV Microbiologia

Este sector encontra-se sob a responsabilidade da Médica Patologista Clínica – Dra. Paula Gama. Neste sector estão presentes 1 TSDT, 2 TS, um Farmacêutico Especialista em Análises Clínicas – Dr. Luís Morais e a Dra. Arminda Gonçalves, Bióloga especialista em Análises Clínicas. O Dr. Luís Morais ficou designado como o meu orientador externo.

Um pedido de estudo microbiológico é motivado pela suspeita de um processo infeccioso. Assim, o principal objetivo do trabalho efetuado neste setor é a identificação dos microrganismos responsáveis por esse processo e a obtenção do respetivo perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos ⁽⁴¹⁾.

São vários os produtos biológicos analisados neste sector: urina, sangue, exsudados (purulento/vaginal/retal), fezes, e secreções respiratórias (expectoração, lavado/aspirado broncoalveolar). Contudo existe uma panóplia de outros produtos biológicos que poderão chegar ao setor da Microbiologia tais como: catéteres, medula óssea (sangue medular), líquido cefalorraquidiano (LCR), líquidos (pleural, peritoneal, pericárdico, sinovial), bÍlis, aspirados de gânglios/quistos, biópsias cirúrgicas e material protésico.

Dependendo do produto biológico e do pedido feito pelo clínico, realizam-se diferentes análises microbiológicas: bacteriológicas, parasitológicas, micológicas e micobacteriológicas. Estas análises requerem procedimentos, normas de segurança e de manuseamento específicos e, tais procedimentos/normas, estão todos descritos nos manuais internos e em instruções de trabalho do SPC.

Para que possa ser fornecida informação para o diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas tem de ser garantida a qualidade das amostras, isto é, que estas tenham sido colhidas, acondicionadas e transportadas de forma correta e que estejam munidas de informação clínica que seja pertinente ⁽⁴²⁾.

Uma vez que a microbiologia está centralizada na unidade de Tomar, aqui são recebidos todos os produtos provenientes das outras unidades sendo vital o correto transporte das amostras.

Os produtos são recebidos no setor aplicando, de forma rigorosa, os critérios de rejeição de amostras. Dá-se prioridade às amostras que não se encontram em meio de transporte, seja na receção dos produtos seja no seu processamento. Feita a receção dos produtos as etiquetas de identificação das placas são impressas.

O setor possui vários equipamentos: 4 estufas (3 delas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 1 a 25°C), 3 câmaras de fluxo laminar, 2 equipamentos de coloração automatizados – corador de lâminas PolyStainer[®] e o Aerospray[®], um equipamento para identificação e teste de suscetibilidade aos

antimicrobianos (TSA) Vitek®2 da bioMérieux, BACTEC™9120 – equipamento para as hemoculturas, BACTEC™9000MB – equipamento para hemoculturas de micobactérias, e 2 equipamentos de biologia molecular com análise feita por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) - GeneXpert™ e o FilmArray™. Ao longo do relatório referir-me-ei, com mais detalhe, a alguns deles.

IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS E OUTROS MICRORGANISMOS

1. Exame direto a fresco

Consiste na observação direta, microscopicamente, da amostra sem esta ser fixa ou corada, permitindo fazer uma avaliação semi-quantitativa dos elementos celulares e MO – bactérias, fungos e parasitas. Permite observar não só MO vivos, preservando a sua morfologia e mobilidade, mas também o tipo de agrupamento das bactérias ou presença de outras células.

É um procedimento simples, em que o produto biológico é colocado entre lâmina e lamela, e depois observado nas objetivas de 10x e 40x. Se se tratar de urina, antes de ser observada, deve ser centrifugada a 1500rpm-10 min.

2. Exame direto com coloração: coloração de Gram

Este tipo de coloração foi desenvolvido em 1884 pelo bacteriologista dinamarquês Hans Christian Gram ⁽⁴³⁾. É a coloração mais utilizada em microbiologia, sendo um dos procedimentos de coloração mais úteis pois, através deste método, torna-se possível classificar as bactérias em 2 grandes grupos: Gram-positivo e Gram-negativo, tornando-a numa coloração diferencial ⁽⁴³⁾.

Esta técnica aplica-se às amostras de produtos biológicos ou a colónias isoladas provenientes do exame cultural. Permite fazer a identificação presuntiva do agente infeccioso bem como avaliar a qualidade da amostra e da flora saprófita existente, também permite distinguir as formas e/ou arranjo das bactérias: estas podem ser cocos, bacilos, espirilos ou vibriões.

Os diferentes tipos de bactérias reagem de modo distinto à coloração de Gram pois existem diferenças estruturais nas suas paredes celulares, que vão afetar a retenção ou a libertação do corante (combinação do complexo cristal de violeta e iodo). As bactérias Gram-positivo possuem uma parede celular de peptidoglicano mais espessa que as bactérias de Gram-negativo. O cristal de violeta (roxo) e o iodo penetram facilmente dentro das células não podendo ser removidos, pelo álcool-acetona, da camada intacta do peptidoglicano das células Gram-positivo. Consequentemente, as células Gram-positivo vão reter a cor do

corante cristal violeta. Já nas células Gram-negativo, a presença de uma fina camada de peptidoglicano rodeada por uma membrana externa de lipopolissacarídeos e proteínas, faz com que esta não retenha o cristal de violeta, deste modo a lavagem com álcool-acetona remove o corante. Como resultado, as bactérias Gram-negativo permanecem incolores até serem coradas com o 2º corante de contraste - a safranina - onde adquirem a cor rosa. Em resumo, as bactérias Gram-positivas retêm o corante e permanecem com a cor roxa e as Gram-negativo apresentam-se de cor rosa ⁽⁴³⁾.

Após o esfregaço ter sido fixado pelo calor, é colocado no equipamento de coloração que se encontra no setor – Aerospray®. A Figura 6 representa os passos manuais desta coloração (o equipamento faz o mesmo, mas de modo automatizado): 1. Cristal de violeta (1º corante): 1 minuto; 2. Lavagem com água corrente: 1,5 minutos; 3. Iodo (mordente, que ajuda a fixar o primeiro corante): 1 minuto; 4. Lavagem com água corrente: 1,5 minutos; 5. Descoloração com solução álcool/acetona (solvente orgânico): 1 minuto; 6. Lavagem com água corrente: 1 minuto; 7. Safranina (2º corante, contraste): 1 minuto; 8. Lavagem com água corrente; 9. Secagem da lâmina ⁽⁴⁴⁾.

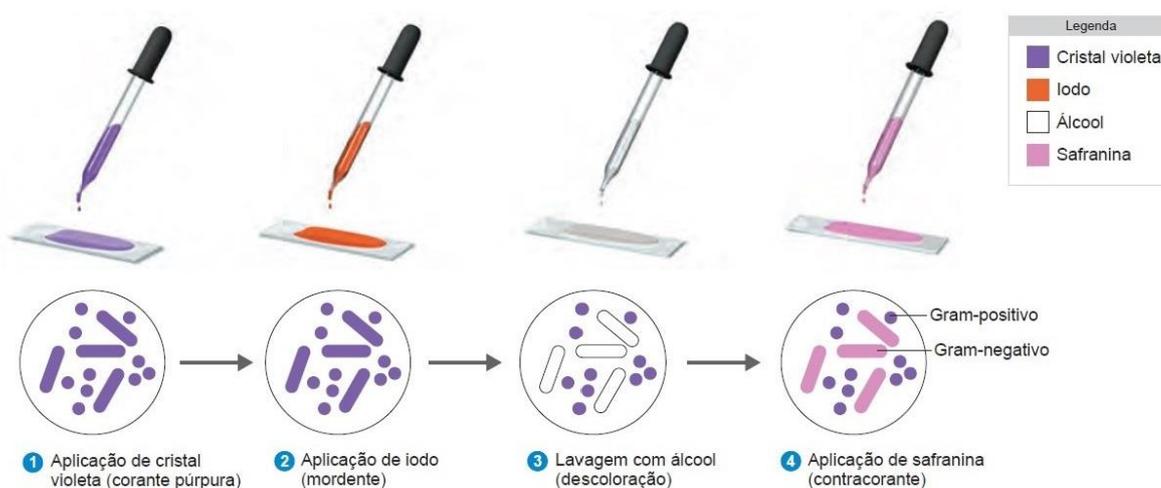


Figura 6 - Passos manuais da coloração de Gram ⁽⁴³⁾.

Fonte: TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. – **Microbiologia**. 10ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

3. Exame direto com coloração: coloração Kinyoun (ou Ziehl-Neelsen Modificada) e Auramina O

A coloração de Kinyoun, permite detectar a presença de bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR), nomeadamente os do género *Mycobacterium*. Estas bactérias possuem uma parede

celular distinta, que é estruturalmente semelhante à das bactérias Gram-negativo, mas nas micobactérias a camada mais externa de lipopolissacarídeos é composta pelos ácidos micólicos, formando-se uma camada serosa e resistente à água – conferindo hidrofobicidade. Isso torna as bactérias resistentes à descoloração com soluções ácido-álcool ⁽⁴³⁾.

O método **Ziehl-Neelsen** é o método mais antigo para corar BAAR mas este requer aquecimento da amostra, levando à libertação de vapores tóxicos durante o procedimento o que fez com que muitos laboratórios o tivessem substituído pela coloração ácido-álcool resistente “a frio” – **método de Kinyoun** – ou a coloração com fluorocromo (**método da Auramina**) ⁽⁴³⁾, como acontece no SPC.

O princípio da coloração Kinyoun é o mesmo do método Ziehl-Neelsen, em que os organismos corados com fucsina básica (carbolfucsina básica ou fucsina fenicada – mistura de fenol com fucsina básica) vão resistir à descoloração com as soluções ácido-álcool. O fundo é contra-corado com azul de metileno e os organismos aparecem corados de vermelho num fundo azul. Para captar a fucsina é necessário aquecimento da amostra – coloração “a quente” e na de Kinyoun não requer aquecimento; isto porque no método Ziehl- Neelsen o calor atua como um mordente físico enquanto que no método de Kinyoun o fenol da carbolfucsina vai funcionar como um mordente químico ⁽⁴⁵⁾.

A coloração pela Auramina O requer a utilização de microscopia de fluorescência para a observação de esfregaços de produtos descontaminados. É utilizado um corante em que os BAAR aparecerem com fluorescência verde-amarelada contra um fundo escuro.

Antes de se realizar a coloração, os esfregaços são fixados pelo calor, depois colocados no equipamento que realiza os 2 tipos de coloração - PolyStainer[®].

4. Provas clássicas de identificação bacteriana

Testes de identificação Presuntiva

a. Prova da catalase

Esta prova é usada para identificar MO que têm a capacidade de usar a catalase, uma enzima intracelular capaz de decompor o peróxido de hidrogénio em oxigénio e água. Esta prova serve para distinguir *Staphylococcus* spp de *Streptococcus* spp, sendo os primeiros catalase positiva (+) e os segundos catalase negativa (-). Com o auxílio de uma ansa ou ponta de uma pipeta de Pasteur, transferir uma colónia pura da cultura em estudo para uma lâmina de vidro, adicionar uma gota de peróxido de hidrogénio a 3% e verificar se há formação de bolhas de ar (resultado positivo). Ter apenas atenção que culturas com mais de 24h podem resultar em

falsos negativos, já os falsos positivos podem surgir quando se usam colónias retiradas a partir de meios que contenham sangue – devido à existência de catalase nos eritrócitos ⁽⁴²⁾.

b. Prova da coagulase

Normalmente realiza-se esta prova quando estamos perante um resultado “catalase +”, confirmando a presença de *Staphylococcus*. Este teste permite fazer a identificação presuntiva de *Staphylococcus aureus*. Esta prova é feita em tubo com plasma de coelho onde se inocula uma colónia isolada da cultura em estudo, com a incubação a $35\pm 2^\circ\text{C}$; ao fim de 4h faz-se uma leitura, sem agitar o tubo, e se se verificar a formação de um coágulo a prova é considerada positiva. A coagulase livre, ou seja, aquela que foi libertada pelas células, vai atuar na protrombina, dando a origem a uma substância semelhante à trombina, que vai atuar no fibrinogénio originando um coágulo de fibrina ⁽⁴²⁾. No SPC usa-se o teste comercial BD BBL™ Coagulase Plasmas.

c. Prova da oxidase (citocromo-oxidase)

A prova da oxidase é utilizada em bacilos de Gram-negativo, de modo a distinguir as enterobactérias – oxidase negativa – de outros bacilos de Gram-negativo – oxidase positiva – como por exemplo *Pseudomonas*. Para a realização desta prova usam-se testes comerciais (BBL™ DrySlide™ Oxidase) com papel de filtro impregnado de tetrametil-p-fenilenediamina dihidroclorato 1% e o ácido ascórbico como agente redutor e estabilizador.

No estado reduzido, o di-hidroclorato tetrametil-p-fenilenediamina é um reagente é incolor. Se o MO produzir citocromo oxidase, não haverá oxidação direta do reagente, mas sim do citocromo C que, por sua vez, irá oxidar o reagente, formando-se um composto de cor púrpura/azul-arroxeadada sobre o papel de filtro, em cerca de 10 segundos, indicando a positividade do teste. A oxidase é uma hemoproteína que atua como elo final na cadeia de respiração aeróbia.

A colónia que se quer testar é retirada com uma ansa (não metálica) e colocada sobre o papel de filtro. Nota: não se deve usar ansas de metal porque os produtos de oxidação do metal, que se formam aquando do aquecimento da ansa, podem resultar em reações falsamente positivas ⁽⁴²⁾.

d. Prova da urease

O meio reacional, onde se efetua o teste, contem ureia que ao ser degradada pela urease o torna num meio alcalino; este tem um indicador de pH (vermelho de fenol) que, perante esta alcalinização, muda da cor amarela para rosa forte ⁽⁴⁶⁾. Quando positiva, permite excluir a presença de *Salmonella* spp e *Shigella* spp (urease negativa) em amostras de fezes. No

SPC recorre-se ao teste comercial Meio ureia indol, da bioMérieux. Para a realização desta prova pipetam-se cerca de 0,5 mL de reagente para um tubo e inocula-se cerca de 2-3 colónias do MO em estudo, com incubação a $35^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 18-24h ⁽⁴⁶⁾.

e. Teste de suscetibilidade à Optoquina

A prova de sensibilidade à optoquina é utilizada para a identificação presuntiva de *Streptococcus pneumoniae*.

A optoquina, é um antimicrobiano que se difunde facilmente num meio de cultura sólido, permitindo a observação de um halo de inibição do crescimento de *Streptococcus pneumoniae* ⁽⁴⁷⁾.

Este teste é usado para diferenciar o *Streptococcus pneumoniae* (previsivelmente sensível à ação da optoquina) de outros *Streptococcus* spp α -hemolíticos (previsivelmente resistentes à optoquina).

Para a realização deste teste prepara-se uma suspensão do MO a testar, com uma turvação de 0,5 McFarland (medida no densitómetro); inocula-se a suspensão numa gelose de sangue (COS), coloca-se o disco de optoquina (com a ajuda de uma pinça esterilizada ao bico de Bunsen) sobre a gelose. De seguida coloca-se a placa a incubar na estufa de $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ com aproximadamente 5% de CO_2 , durante 18-24h. Após incubação, procede-se à leitura do halo de inibição com o auxílio de uma régua. Se halo < 14mm: o MO é resistente à optoquina e pode presumir-se que não se trata de *Streptococcus pneumoniae*. Se halo > a 14mm: estirpe é sensível à optoquina, podendo presumir-se a identificação de *Streptococcus pneumoniae*.

5. Outros testes de pesquisa de MO realizados no SPC

a. Teste de Identificação da *Escherichia coli* O157:H7

Teste Comercial: *E. coli* O157 Latex Test (Oxoid)

Amostra: Coprocultura. É necessário testar pelo menos 10 colónias.

Objetivo: Identificação do serogrupo *E. coli* O157.

Método: Reação de aglutinação.

Sensibilidade: 100%; **Especificidade:** 99%. ⁽⁴⁸⁾

b. Teste para identificação de *Streptococcus pneumoniae*

Teste Comercial: Dryspot™ Pneumo Test (Oxoid)

Amostra: Colónias com morfologia sugestiva de *Streptococcus* spp. α -hemolíticos.

Objetivo: Pesquisar o antígeno capsular do *Streptococcus pneumoniae* de modo a distingui-lo de outros *Streptococcus* α -hemolíticos.

Método: Reação de aglutinação.

Sensibilidade: 97,9%; **Especificidade:** 93,2%. ⁽⁴⁹⁾

c. Teste Screening para *Streptococcus* do Grupo A

Teste Comercial: Clearview[®] Exact Strep A Cassette (Alere[™])

Amostra: Exsudado faríngeo sem meio de transporte.

Objetivo: Pesquisar o antígeno de *Streptococcus* β -hemolítico do Grupo A (Strep A).

Método: Imunocromatografia

Sensibilidade: 95,2%; **Especificidade:** 99%. ⁽⁵⁰⁾

d. Teste Screening para *Streptococcus pneumoniae*

Teste Comercial: *Streptococcus pneumoniae* Antigen Card (Alere[™] BinaxNOW[®])

Amostra: Urina. LCR

Objetivo: Pesquisar o antígeno solúvel de *Streptococcus pneumoniae*

Método: Imunocromatografia

Sensibilidade: Urina – 90%; LCR – 97%; **Especificidade:** Urina – 78%; LCR – 99%. ⁽⁵¹⁾

e. Teste Screening para *Legionella pneumophila*

Teste Comercial: Legionella K-SeT (Coris BioConcept)

Amostra: Urina

Objetivo: Pesquisar o antígeno solúvel de *Legionella pneumophila* do serogrupo I.

Método: Imunocromatografia

Sensibilidade: 97,6%; **Especificidade:** 100%. ⁽⁵²⁾

f. Teste Screening para *Clostridioides difficile*

Teste Comercial: RIDA[®]QUICK (R-biopharm)

Método: Imunocromatografia

f.1. Pesquisa da Glutamato Desidrogenase (GDH)

Objetivo: Pesquisar a GDH de *Clostridioides difficile*

Sensibilidade: 100%; **Especificidade:** 95%

Nota: sempre que o resultado for positivo, é obrigatória a determinação da produção das toxinas A e B associadas a esta infecção. ⁽⁵³⁾

f.2. Pesquisa das Toxinas A/B

Objetivo: Pesquisar as toxinas A e B de *Clostridium difficile*

Sensibilidade: 100%; **Especificidade:** 91%

Nota: No caso de a pesquisa da GDH ser positiva e a pesquisa da toxina ser negativa, é obrigatório fazer-se a pesquisa do gene da toxina por PCR. ⁽⁵⁴⁾

g. Teste Screening para *Campylobacter* spp.

Teste Comercial: RIDA[®]QUICK (R-biopharm)

Amostra: Fezes

Objetivo: Pesquisar o Ag de *Campylobacter jejuni* e/ou *Campylobacter coli*.

Método: Imunocromatografia.

Sensibilidade: 98,4%; **Especificidade:** 98,6%. ⁽⁵⁵⁾

h. Pesquisa de Vírus

h.1. Teste Screening para Rotavírus e Adenovírus

Amostra: Fezes

Objetivo: Pesquisar a presença de Adenovirus/Rotavirus.

Método: Imunocromatografia.

Adenovírus – Sensibilidade: 90%; **Especificidade:** 100%

Rotavírus – Sensibilidade: 100%; **Especificidade:** 99%. ⁽⁵⁶⁾

h.2. Teste Screening para Vírus Sincial Respiratório (VSR)

Teste Comercial: BinaxNOW[®] RSV, (Alere[™])

Amostra: Exsudado nasofaríngeo ou lavado nasal

Objetivo: Pesquisar o antígeno das proteínas de fusão do VSR.

Método: Imunocromatografia.

Sensibilidade: Lavado nasal 89%; Zaragatoa 93%;

Especificidade: Lavado nasal 100%; Zaragatoa 93%. ⁽⁵⁷⁾

h.3. Pesquisa do Vírus Influenza A e B

Amostra: Exsudado nasofaríngeo em meio de transporte para vírus.

Objetivo: Pesquisar o RNA do Vírus Influenza A e B.

Método: PCR em tempo real. ⁽⁵⁸⁾

h.4. Pesquisa do Vírus Papiloma Humano de Alto Risco

Amostra: Exsudado endocervical sem meio de transporte.

Objetivo: Rastreamento do DNA do Vírus do Papiloma Humano de alto risco e identificação dos sub-tipos 16 e 18/45.

Método: PCR em tempo real. ⁽⁵⁹⁾

6. Métodos de identificação e TSA automatizados

Sistema Vitek[®]2

Representa o equipamento mais importante do setor de microbiologia do SPC do CHMT. Este equipamento destina-se à identificação e realização de TSA a bactérias e leveduras. Até à data em que permaneci neste setor, o Vitek[®]2 era o principal meio de realização de identificações e TSA contudo, na reta final do estágio, chegou ao setor um novo equipamento, para ser usado em paralelo, o Microflex LT/SH da Bruker – um sistema MALDI-TOF (espectrometria de massa) de bancada.

Relativamente a funcionamento do Vitek[®]2, este usa cartas seladas com poços que contêm substratos bioquímicos. As cartas têm substratos específicos para os grupos de MO a identificar: Gram-positivo, Gram-negativo, anaeróbios, fungos leveduriformes, fastidiosos (há uma carta para os géneros *Neisseria* ou *Haemophilus*).

Identificação e TSA

Para a identificação e TSA do MO, prepara-se uma suspensão em 3mL de solução salina, das colónias em estudo (puras), com uma turvação pré-estabelecida, medida através de um densitómetro (*Densichek*). A turvação necessária depende do tipo de microrganismo em estudo: 0,5-0,65 McFarland para a maioria das bactérias de Gram-positivo e Gram-negativo, 1,8-2,2 McFarland para leveduras, 2,8-3,3 McFarland para *Neisseria* spp, HACEK (*Haemophilus* spp, *Aggregatibacter*, *actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* e *Kingella kingae*), anaeróbios e *Corynebacterium* spp. O tubo é então colocado em suporte próprio no equipamento Vitek[®]2, com as cartas adequadas à sua identificação e TSA.

Identificação

A suspensão é aspirada para o interior das cartas, sujeitas a incubação e são monitorizadas pelo sistema ótico de transmissão, que verifica as alterações de cor – método de colorimetria. As cartas possuem poços com substratos bioquímicos liofilizados, que são metabolizados pelas bactérias ou fungos. Esta metabolização pode gerar alterações de cor, sendo essa alteração de cor lida pelos sensores fotométricos presentes no equipamento permitindo, assim, identificar o MO em estudo.

Usam-se as seguintes cartas de identificação: Carta GP (bactérias Gram positivo); Carta GN (bactérias Gram negativo); Carta NH (para *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp., *Campylobacter* spp.); Carta YST (para leveduras); Carta ANC (para bactérias anaeróbias e *Corynebacterium* spp). Posteriormente, os resultados são verificados e enviados para o sistema informático *Modulab*.

TSA

As cartas para TSA contêm poços com vários antimicrobianos liofilizados em diferentes concentrações, nos quais as bactérias ou leveduras, consoante o seu crescimento, levam a uma alteração da turvação do meio. Esta é lida por sensores fotométricos, determinando-se a concentração mínima inibitória (MIC) para cada um dos antimicrobianos e, assim, obter o TSA do MO em causa – método de turbidimetria.

Cartas para TSA: Carta AST-N355 (*Enterobacterales*), Carta AST-N373 (*Pseudomonas* spp., e eventualmente *Enterobacterales* multirresistentes), Carta AST-P648 (para *Staphylococcus* spp.), Carta AST- P586 (para *Enterococcus* spp.); Carta AST-ST03 (para *Streptococcus* spp.) e a Carta AST-576 (*Streptococcus pneumoniae*).

Os resultados expressos são baseados em *breakpoints* e interpretam-se como sensível, intermédio ou resistente. O equipamento está programado para analisar e/ou interpretar os resultados de acordo com as diretrizes em vigor: EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). Quando há dúvidas, resultados inconsistentes, ou caso não haja uma carta para o MO em estudo, como o *Haemophilus* spp, o antibiograma é feito manualmente, usando o método de difusão em disco.

7. Identificação de fungos filamentosos

Aplica-se a todas as colônias de fungos filamentosas em cultura. A identificação requer a análise macroscópica e microscópica. Macroscopicamente, observar o tipo e a cor da colônia (frente e reverso), micélio, a temperatura de crescimento (as placas para pesquisa de fungos incubam-se a 2 temperaturas – 25°C e 35±2°C) e o tempo de incubação. A microscopia permite observar o tipo de hifas (septadas ou não septadas) e outras estruturas distintivas (micro e macroconídeos, clamidósporos, esporângios, conidióforos, entre muitos outros).

Para a observação microscópica é feita uma lâmina pela técnica da “fita-cola”. É uma técnica simples e de fácil execução: colocar uma gota de azul de lactofenol (líquido de montagem) sobre uma lâmina, de seguida basta tocar com a fita-cola na colônia e colá-la sobre a lâmina, cobrir com uma lamela e observar ao microscópio nas ampliações de 100x e 400x.

MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NO SETOR DE MICROBIOLOGIA – SPC

O exame cultural tem como objetivo recuperar os MO em estudo, para identificação e TSA. Existe uma enorme variedade de meios de cultura disponíveis no mercado e é fundamental saber adequar o meio ao produto biológico em estudo bem como ter conhecimento das condições ideais de crescimento dos agentes patogênicos mais prováveis em cada produto biológico.

A natureza dos meios de cultura varia, podendo ser: sólida, semi-sólida ou líquida. No SPC apenas se utilizam meios sólidos ou líquidos. O meio sólido permite visualizar as colônias que se desenvolvem à superfície da gelose, auxiliando na sua identificação. Os meios líquidos destinam-se ao enriquecimento de produtos biológicos. Os meios são escolhidos de acordo com o protocolo que o setor estabeleceu, podendo ser: **meios não seletivos** (não possuem inibidores de crescimento, permitem o crescimento da maior parte dos MO que se encontram nos produtos biológicos), **seletivos** (o meio é composto por uma mistura de antimicrobianos ou substâncias químicas que vão permitir o crescimento de alguns MO em detrimento de outros ficando o crescimento destes últimos inibido), **diferenciais** (apresentam substâncias químicas ou corantes, permitindo distinguir grupos de MO que estejam presentes no mesmo inóculo), de **enriquecimento** (estes contêm nutrientes que permitem a multiplicação dos MO que se encontrem com baixo inóculo/concentração, num determinado produto biológico), de **transporte** (o objetivo destes é manter a viabilidade dos MO até ao processamento: meio de Amies para exsudados vaginais e meio de Cary-Blair para fezes), de **identificação** (estes evidenciam as características bioquímicas de certas espécies de MO, tornando possível não só o seu reconhecimento como também a sua identificação).

Assim sendo, os meios disponíveis no SPC- Microbiologia, de acordo com sua classificação, são:

- ⇒ **Meio líquido de enriquecimento não seletivo – BHI** – Caldo Coração Cérebro, *Brain Heart Infusion* e **Caldo Schaedler**.
- ⇒ **Meio líquido de enriquecimento seletivo para *Salmonella* spp. – Selenito** – Caldo Selenito.
- ⇒ **Meio sólido não seletivo – COS** – Gelose de Columbia +5% de Sangue de Carneiro (vulgarmente, gelose de sangue) e **PVX** - Gelose Chocolate + PolyViteX™⁽⁶⁰⁾.
- ⇒ **Meio sólido seletivo – HAE2** – Gelose Chocolate *Haemophilus* 2 (seletivo para *Haemophilus* spp.), **CNA** – Gelose COS com ácido nalidíxico e colistina (seletivo para Gram-positivo), **VCA3** – Gelose Chocolate VCAT (seletivo para *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*), **CAM** – Gelose Campyloset (seletivo para *Campylobacter* spp), **YER** – Gelose *Yersinia* (seletivo para *Yersinia* spp)⁽⁶⁰⁾.
- ⇒ **Meio sólido seletivo e diferencial – HEK** – Gelose Hektoen (seletivo e diferencial para a *Salmonella* spp. e *Shigella* spp). **MCK** – Gelose MacConkey (seletivo e diferencial para Gram-negativo)⁽⁶⁰⁾.
- ⇒ **Meio sólido não seletivo e diferencial – CLED** – Gelose Cistina, Lactose, Deficiente em Eletrólitos⁽⁶⁰⁾.
- ⇒ **Meio sólido cromogénico e diferencial – STRB** – Gelose ChromID® Strepto B (cromogénico e diferencial para *Streptococcus agalactiae* (Grupo B))⁽⁶⁰⁾.
- ⇒ **Meio sólido seletivo para leveduras e fungos – SGC2** – Gelose Sabouraud com Cloranfenicol 2⁽⁶⁰⁾.
- ⇒ **Meio sólido cromogénico – MRSM** – Gelose ChromID® MRSA SMART⁽⁶⁰⁾.

No Anexo II, encontra-se a descrição de cada meio de cultura referido anteriormente.

PROCESSAMENTO DAS AMOSTAS

Tipos de sementeiras

Existem vários tipos de sementeiras bem como técnicas para as executar. Os meios são semeados do menos seletivo para o mais seletivo. A técnica por esgotamento ou 4 quadrantes ou roseta (Figura 7, esquerda) é utilizada para isolamento de colónias, em todos os meios sólidos. A técnica de sementeira para quantificação (Figura 7, direita) de colónias é feita com uma ansa calibrada e apenas é usada para a urina. A técnica de sementeira por

espalhamento ou sementeira em toalha com zaragatoa (Anexo 12, Figura 8) é utilizada na sementeira de meios cromogénicos, ChromID MRSA e ChromID StreptoB, e para execução de TSA. Quando estamos perante um meio líquido a inoculação é feita com uma ansa, pipeta ou zaragatoa, adicionando uma pequena porção da amostra ao meio, homogeneizando. A técnica de sementeira por inundação, consiste em verter o líquido biológico sobre a gelose e espalhar através de movimentos rotativos, girando a placa, com o objetivo de aumentar o inóculo da amostra. O método Maki aplica-se a catéteres e basta rolar o catéter sobre a gelose, com o auxílio de uma pinça ou ansa esterilizada.

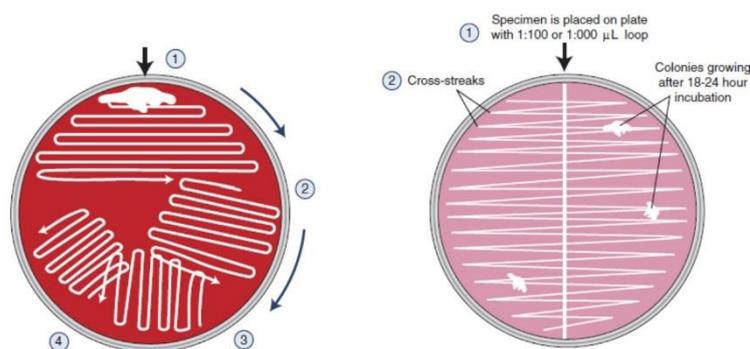


Figura + - Técnicas de sementeira: por esgotamento (à esquerda) e para quantificação (à direita) ⁽⁶¹⁾.

Fonte: MAHON, Connie R.; LEHMAN, Donald C.; MANUSELIS, George – **Textbook of Diagnostic Microbiology**. 5º Ed. New York: Saunders, 2014.

Amostras

Consoante o tipo de amostra, esta é processada de maneira específica e tendo em conta as suas características. O patologista tem de ser detentor de um enorme conhecimento sobre a flora microbiana normal de cada local do organismo, de onde provêm as amostras, para não se correr o risco de se sobrevalorizar MO que não são o agente causador da infeção. Contudo, também é importante ter em atenção que se esses MO (da flora normal) estiverem em nº superior ao esperado, terão de ser levados em conta aquando da validação dos resultados. O desafio é a distinção entre colonização e infeção. Não esquecendo também que pode haver a possibilidade de ocorrerem contaminações levando a falsos resultados.

As amostras mais comuns no setor de microbiologia do SPC são:

I. Urina

As infeções do trato urinário são as mais comuns em todo mundo bem como em ambiente hospitalar, o que faz da urina o produto mais frequente recebido no setor. O trato urinário de um indivíduo normal é estéril até à parte terminal da uretra, as infeções urinárias podem surgir em qualquer indivíduo independentemente da idade ou do sexo, contudo, por questões anatómicas, as mulheres apresentam maior propensão para tal. Quando afetam homens, a causa mais comum é a hipertrofia benigna da próstata e a obstrução da uretra. As infeções do trato urinário classificam-se como cistite, quando afeta o trato urinário inferior ou como pielonefrite, quando atinge o trato urinário superior. Em qualquer dos casos o agente patogénico mais comum é uma enterbactéria, a *Escherichia coli* ⁽⁶²⁾.

Colheita e processamento

É fundamental uma correta colheita da urina para se evitar contaminações com a flora comensal. Deve ser colhida a primeira urina da manhã porque é a mais concentrada. O utente deve lavar os órgãos genitais com água e sabão, sem usar agentes desinfetantes, colher uma parte do jato médio para um contentor estéril. No caso de serem amostras de outras unidades, cujo transporte até à unidade de Tomar é necessário, a urina é colocada em meio de transporte, isto é, num tubo contendo ácido bórico: estabilizador, tem como função conservar o número de bactérias, mantendo a viabilidade das mesmas até 48h, à temperatura ambiente, é importante respeitar a marca de enchimento pois são precisos 10 mL de urina para se obedecer à proporção urina-estabilizador. Existem ainda outros métodos de colheita: punção suprapúbica – aqui a urina é colhida diretamente da bexiga – garantindo que todos os MO aqui presentes serão relevantes; no caso de serem pacientes com sonda vesical, deve desinfetar-se a sonda antes da punção. A urina nunca deve ser colhida a partir do saco coletor.

Assim que as amostras chegam ao setor é realizada a urocultura, procedendo à sementeira com posterior quantificação dos MO. e uma análise sumária da urina (tipo II), que inclui a observação do sedimento urinário ao microscópio. A análise sumária da urina é feita no Aution Max AX4280.

De modo a quantificar os MO, as urinas são semeadas no meio CLED com uma ansa estéril calibrada de 1 µL. Feita a sementeira, esta é incubada a 35°C ± 2°C, por 18-24 horas. De notar que se a urina for proveniente de uma grávida ou de uma colheita supra-púbica, vai ser também semeada em COS, de modo a detetar-se a presença do *Streptococcus* β-hemolítico do Grupo B. A importância deste MO é referida no capítulo “exsudados vaginais”.

Resultados

Uma urocultura para ser considerada positiva tem de preencher vários critérios de validação. Considera-se “positiva” quando a contagem do número de colónias for superior a 10^5 unidades formadoras de colónias (UFC) por mililitro (mL) (10^5 UFC/mL), correspondendo há existência de 100 UFC observadas em cultura ⁽⁴²⁾. É considerada positiva com menos de 10^5 UFC/mL nas colheitas por punção supra-púbica (técnica asséptica). Perante a presença de 3 ou mais tipos de colónias considera-se que a amostra se encontra contaminada e, nesse caso, deve solicitar-se nova colheita.

2. Sangue

As hemoculturas – cultura de sangue – constituem o meio para a deteção de uma bacteriémia, que pode ser transitória, intermitente ou contínua ⁽⁴⁵⁾. Quando se isola um MO a partir da hemocultura, por norma, é esse o agente etiológico da infeção. É por isso muito importante a sua identificação para se poder instituir uma adequada terapêutica ⁽⁶³⁾. O pedido de uma hemocultura surge no contexto de febre ou febre sem foco conhecido, de choque ou quando se suspeita de uma infeção num determinado local com sintomas associados ⁽⁶³⁾.

Colheita e processamento

A correta colheita das hemoculturas é a base de um resultado seguro devendo obter-se uma amostra livre de contaminações e com um volume correto. O volume de sangue colhido assume especial importância devido à baixa concentração de MO presentes. Recomenda-se a colheita de 40mL para os adultos e de 3 a 5 mL para as crianças ⁽⁶⁴⁾. Este menor volume deve-se à maior concentração de MO nas bacteriémias das crianças.

Deve desinfetar-se o local a puncionar com 2 anti-sépticos diferentes: cloroexidina 2%, e solução alcoólica para evitar contaminação com os MO existentes na superfície da pele.

No adulto são colhidos 2 pares de hemoculturas, sendo cada par constituído por um frasco de aerobiose e um de anaerobiose e, idealmente, cada par deve ser colhido em braços diferentes, por punção venosa; a colheita deve ser feita antes de se iniciar antibioterapia. Nas crianças apenas é colhido 1 frasco de hemocultura.

Os frascos de hemocultura são recebidos e colocados no equipamento BACTEC™9120 – sistema automatizado de incubação a 37°C, homogeneização e monitorização das hemoculturas. Estes frascos contêm um meio de cultura enriquecido com caldo de soja e caseína. Havendo multiplicação dos MO, verifica-se um aumento de consumo de O₂ com correspondente aumento da produção de CO₂ assim como da fluorescência, sendo

esta detetada pelo sensor presente no equipamento. Esta positividade, gera um alerta que é transmitido para o *Modulab*.

O tempo de incubação preconizado é de 5 dias, e de 11 dias para a pesquisa de fungos.

Resultados

Se passados os 5 dias não houver alerta do equipamento, a amostra é considerada negativa e é essa informação que sai para o clínico.

Caso o equipamento emita um alerta de positividade no período de incubação, prossegue o exame microbiológico. Semeia-se uma placa de COS e faz-se uma lâmina de Gram por cada frasco. Incubar a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, em atmosfera enriquecida com 5% de CO_2 , 18-24h. A coloração de Gram permite orientar a necessidade de inocular outros meios, dependendo do que foi observado. Após observação do Gram e das colónias em placa, procede-se à identificação e TSA do MO, no Vitek[®]2.

O sangue é um líquido que, em condições normais é estéril, a presença de MO deve ser valorizada mas é necessário distinguir uma verdadeira infeção de uma possível contaminação. Caso se tenha isolado um comensal da pele, este apenas se valoriza se estiver presente em pelo menos 2 hemoculturas de punções diferentes.

Quando no Gram se observam MO que não crescem em cultura, estamos perante um MO que precisa ou de maior aporte nutricional que o fornecido pelo COS, como é caso do *Haemophilus*, ou de uma atmosfera diferente como no caso dos anaeróbios.

3. Ponta de catéter

Grande parte das infeções nosocomiais da corrente sanguínea associam-se ao uso de catéteres centrais, verificando-se que as taxas de bacteriémia, nestes doentes, são substancialmente mais elevadas quando comparadas com as dos doentes sem cateter ⁽⁶⁵⁾. Quando se suspeita que a infeção possa ser causada pelo uso do catéter, este pode ser retirado e enviado para o SPC.

Colheita e processamento

Após ter sido retirado, deve cortar-se a ponta do catéter na dimensão de 4 cm e colocada em contentor estéril e seco. A ponta do catéter deve ser sempre acompanhada de uma hemocultura periférica. A ponta é semeada pela técnica de Maki em COS. Incuba-se a gelose a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, 18-24h.

Resultados

A cultura é considerada positiva se apresentar 15 ou mais colónias da mesma estirpe na placa e se for acompanhada de um resultado coincidente na hemocultura, caso isto não se verifique, considera-se contaminação.

4. Secreções Respiratórias

Há vários tipos de amostras de secreções respiratórias (expetoração, aspirado brônquico, lavado bronco-alveolar) sendo a mais comum a de expetoração pela maior facilidade da colheita.

Colheita e processamento

A expetoração deve ser colhida, preferencialmente, de manhã (mais concentrada) mediante tosse profunda não devendo conter saliva, num contentor estéril. A colheita deve ser feita em jejum e após uma adequada higiene oral. Quando há dificuldade na obtenção da amostra, a expetoração é induzida com solução salina. Uma correta colheita define um bom resultado pois surgem com muita frequência amostras contaminadas com secreções da orofaringe.

As lâminas para observação do Gram são feitas por esmagamento da amostra, dada a sua heterogeneidade. A observação do Gram assume um papel adicional, no caso das amostras de expetoração, porque permite avaliar a qualidade da amostra.

Observa-se a quantidade de células epiteliais e de leucócitos polimorfonucleares, com ampliação de 100x, recorrendo aos critérios de Murray-Washington (Quadro B):

Grau	Nº de células epiteliais/campo	Nº de leucócitos/campo
Grupo 1	25	10
Grupo 2	25	10-25
Grupo 3	25	25
Grupo 4	10-25	25
Grupo 5	<10	25

Quadro B - Critérios de Murray-Washington ⁽⁴²⁾.

Apenas devem ser valorizadas as amostras dos grupos 4 e 5 ⁽⁴²⁾.

As amostras são semeadas, por rotina, nos meios COS e HAE, caso tenha pedido exame micológico, semeia-se em SGC2. Aquando da inoculação, deve ter-se o cuidado de seleccionar a melhor porção da amostra, ou seja, uma zona purulenta.

Resultados

Depois de avaliados os exames direto e cultural são valorizados os MO eventualmente causadores de infeção, prosseguindo para identificação e TSA dos mesmos no Vitek[®]2.

Os MO mais frequentemente isolados em amostras respiratórias, no SPC, foram: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

5. Fezes

As gastroenterites são infeções bacterianas, parasitárias ou víricas, autolimitadas, embora em ambientes de cuidados de saúde e em populações específicas – recém-nascidos, latentes, idosos ou imunodeprimidos – possam ser potencialmente graves. O diagnóstico rápido aliado a um tratamento adequado e a medidas de controlo da infeção são, particularmente, importantes nestes contextos. Os MO mais comuns causadores desta patologia são: Adenovírus, Rotavírus, *Campylobacter* spp, *Salmonella* spp e *Shigella* spp, *Yersia* spp, *Clostridium difficile* entre outros ⁽⁶⁶⁾.

No SPC são pesquisadas nas coproculturas, por rotina, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Yersia* spp e *Campylobacter* spp. Para a pesquisa outros MO é necessário um pedido médico específico.

Colheita e processamento

Por norma, as fezes são colhidas para um contentor de boca larga estéril. As amostras devem ser enviadas o mais rapidamente possível para o laboratório. Quando tal não for possível, nomeadamente nas amostras provenientes de outras unidades, as fezes são colocadas em meio de transporte Cary-Blair e têm de estar visíveis na zaragatoa. O meio de transporte Cary-Blair é um meio não nutritivo e que mantém a viabilidade dos MO durante o trajeto até ao laboratório ⁽⁶⁷⁾.

Devem ser colhidas 3 amostras em dias diferentes, isentas de contaminação com urina. As fezes são semeadas nos meios HEK, MCK, YER, CAM e Selenito ⁽⁴²⁾. No SPC, para a cultura de *Campylobacter* spp também é utilizado o meio COS, desde que se faça a filtração prévia das fezes (tal procedimento não é possível quando a amostra é enviada em zaragatoa). A filtração serve para separar as *Enterobacterales* de maiores dimensões e menos fastidiosas do

Campylobacter spp, que é um MO mais pequeno e mais fastidioso. O filtro está calibrado para reter as *Enterobacteriales* maiores, ao ficarem retidas não passam para o meio e, assim, não há competição no meio entre as mais e as menos fastidiosas, ficando o meio apenas com as bactérias que conseguem passar pelo filtro, as de menores de dimensões, como é o caso do *Campylobacter* spp.

Resultados

Observar nas placas a presença de colónias típicas de *Salmonella*, *Shigella* ou *Yersinia*. Se houver crescimento no meio CAM, é feita uma coloração de Gram para se observar morfologia característica de *Campylobacter*: bacilos de Gram-negativo curvos, em forma de “S” ou “asa de gaivota”. Procede-se à identificação das colónias suspeitas, prosseguindo para TSA apenas situações pontuais. A campilobacteriose é autolimitada no tempo e não carece de tratamento, quando esta deixa de ser autolimitada e se constata, por parte do médico, que o utente tem de forma persistente a presença de *Campylobacter* spp, nesta situação efetua-se o TSA, a pedido do clínico.

5.1. Outros determinações realizadas em amostras de fezes

Pesquisa de sangue oculto nas fezes

Importante no rastreio do cancro colorretal. A pesquisa é feita com recurso a um teste rápido imunocromatográfico – FOB da ChemTrue® que deteta hemoglobina. O teste tem uma tira de membrana que se encontra revestida com o Ac anti-hemoglobina humana na zona da linha de teste (T) que na presença de hemoglobina, complexa-se com o conjugado aparecendo uma linha na zona de T, o teste apresenta também uma linha de controlo (C), que é um controlo processual interno que vai confirmar o volume de amostra suficiente, a absorção adequada da membrana e as técnicas processuais corretas.

Amostra: 3 amostras de fezes colhidas em dias sucessivos

Pesquisa das Toxinas (A e B) e da glutamato desidrogenase (GDH) de *Clostridioides difficile*

Trata-se de um bacilo de Gram-negativo, responsável por diarreias severas associadas à administração de antibioterapia que, por destruição da flora intestinal comensal, permite o sobrecrescimento do *Clostridioides difficile* – importante agente patogénico nosocomial. É produtor de 2 toxinas (A e B) que vão causar danos característicos nas mucosas, como a

formação de pseudomembranas, que leva a uma inflamação grave do cólon, conhecida como colite pseudomembranosa. GDH é um Ag da parede celular do *Clostridioides difficile*, sendo um marcador muito sensível para a deteção desta estirpe ⁽⁶⁸⁾.

Exame parasitológico

Para o exame parasitológico são necessárias 3 amostras colhidas em dias diferentes ⁽⁴²⁾. Observa-se a amostra macro e microscopicamente. Exame macroscópico: observa-se a cor, consistência, presença de muco e/ou sangue bem como presença de parasitas ou fragmentos de parasitas. Exame microscópico compreende 2 etapas: inicialmente é feito um exame direto (entre lâmina e lamela) a partir de uma preparação a fresco de fezes. De seguida, o exame microscópico é repetido após ser feita a concentração da amostra pelo método Ritchie – técnica que vai permitir concentrar os parasitas no sedimento – adiciona-se lugol e observa-se. No laboratório é usado o kit *Easy Copros* da *Iberkit*. A observação é feita na objetiva de menor ampliação, 10x, percorrendo toda a lâmina, para se ter uma visão global da mesma. Com a objetiva de 40x, procuram-se ovos ou quistos.

No SPC existem outros métodos para pesquisa de parasitas: pesquisa de Ag (*Giardia lamblia*) e técnica de Graham (*Enterobius vermicularis*).

A *Giardia lamblia* (também conhecida como *G. duodenalis* ou *G. intestinalis*) é um protozoário flagelado cuja transmissão pode ser direta (pessoa a pessoa) ou indireta (através de águas e alimentos contaminados). Pode manifestar-se de forma sintomática com diarreia e esteatorreia ou ser assintomática ⁽⁶⁹⁾. A pesquisa do Ag é feita por teste rápido imunocromatográfico *CORIS BioConcept*.

Para a pesquisa de *Enterobius vermicularis* ou oxiúros recorre-se à técnica de *Graham*, que consiste em tocar na zona perianal com a parte aderente da fita-cola, com o auxílio de uma espátula; a colheita deve ser feita de manhã dado que os ovos são depositados durante a noite ^(70; 71). A fita-cola é colada numa lâmina de vidro para se observar ao microscópio.

6. Líquidos de serosas

Incluem-se, nesta categoria, o líquido pleural, sinovial, pericárdico e peritoneal, habitualmente estéreis. Imediatamente após a colheita poderão ser inoculados em frascos de hemocultura, sendo estes enviados para o laboratório.

Processamento

Estes líquidos são sujeitos a centrifugação durante 20 minutos a 1500 rpm, antes de serem semeados, para concentrar os possíveis MO presentes. Após centrifugação, o sedimento é semeado em COS, PVX e BHI e faz-se uma coloração de Gram. A passagem do BHI para os meios sólidos realiza-se quando aquele se apresentar turvo, caso não se verifique turvação esta passagem ocorre às 72h.

Resultados

Consoante a proveniência do líquido, os MO expectáveis variam. Na maior parte das situações estes líquidos foram submetidos a uma contagem celular prévia que poderá ser orientadora na valorização do exame microbiológico

7. Exsudados purulentos

Os exsudados podem dividir-se em 2 grandes grupos: superficiais e profundos.

Exsudados superficiais

Normalmente colhidos em zaragatoa e enviados ao SPC em meio de Amies.

Exsudados de feridas: semear em COS, MCK e BHI e procede-se a uma coloração de Gram. A probabilidade destas amostras serem contaminadas com flora comensal da pele é elevada tornando-se a sua valorização muito difícil. Devem evitar-se as colheitas por zaragatoa, preferindo-se as biópsias tecidulares.

Exsudados oculares e auriculares: semear em HAE2 (o *Haemophilus influenza* é dos agentes etiológicos mais comuns neste tipo de exsudados), COS e BHI, procedendo-se igualmente a uma coloração de Gram.

Exsudado faríngeo: não se semeia nem se faz Gram uma vez que estas amostras são sempre polimicrobianas. Faz-se apenas a pesquisa de *Streptococcus pyogenes* ou *Streptococcus* β -hemolítico do grupo A por teste imunocromatográfico.

Exsudados profundos

São amostras colhidas por aspiração com agulha (com envio da própria seringa sem a agulha), ou por inoculação em Portagerm Amies Agar ou inoculação em frasco de hemocultura. Semear em COS, MCK e BHI. Adicionalmente, devem ser pesquisados

anaeróbios com sementeira em SCS e caldo Schaedler em atmosfera de anaerobiose (GENbag). As sementeiras de anaerobiose devem ser feitas paralelamente em aerobiose permitindo concluir se estamos perante um anaeróbio estrito ou facultativo.

8. Exsudados vaginais

Colheita por zaragatoa e transporte em meio de Amies.

Por rotina, quando esta amostra chega ao setor é feito um exame direto a fresco, uma coloração de Gram e sementeira em COS, VCA3 e meio cromogénico CAN. No exame direto a fresco o objetivo é observar *Trichomonas vaginalis* que apresenta características próprias de morfologia e mobilidade e dificilmente se observa na coloração de Gram. O Gram vai permitir observar a existência de células epiteliais, leucócitos polimorfonucleares, flora microbiana (incluindo a flora comensal – lactobacilos/ bacilo de Döderlein). Também permite a identificação presuntiva de *Gardnerella vaginalis/Mobiluncus*: células epiteliais cobertas de cocobacilos Gram-variável – “clue-cells”.

O VCA3 vai permitir isolar as diferentes espécies de MO mais fatidiosos, como é o caso da *Neisseria gonorrhoeae*, importantíssimo agente etiológico de doenças sexualmente transmissíveis. O meio ChromID CAN permite isolar *Candida albicans* que, apesar de fazer parte da flora comensal, havendo desequilíbrios desta pode tornar-se patogénica.

É também numa amostra de exsudado vaginal que é feita a pesquisa de *Streptococcus agalactiae* (grupo B) nas grávidas, por inoculação no meio ChromID Strepto B. Após incubação a $35\pm 2^\circ\text{C}$ por 18-24h, nos casos de portadoras deste MO observam-se colónias cor rosa claro a vermelho. Na grávida o *screening* deste MO assume uma enorme importância porque, na presença deste, pode haver complicações (meningites ou pneumonias) para o bebé no momento do parto.

9. Exsudados para rastreios (*screening*) epidemiológicos

Exsudado nasal e exsudado perineal: para *screening* de MRSA.

Semear em ChromID MRSA. Após incubação a $35\pm 2^\circ\text{C}$ por 18-24h, nos casos de portadores deste MO observam-se colónias cor rosa a vermelho. Este *screening* permite detetar os portadores de MRSA, um dos MO epidemiologicamente mais importantes (pela multiplicidade de infeções que provoca e pela múltipla resistência aos antimicrobianos). Para os doentes da Unidade de Cuidados Intensivos Polivalentes (UCIP) a pesquisa de MRSA é feita por PCR em tempo real, no equipamento GeneXpert® System, da Cepheid® (pesquisa dos genes *mecA* e *mecC*).

Exsudado perineal: para *screening* de *Enterococcus* Resistente à Vancomicina (VRE).

Apenas disponível para os doentes da UCIP, feito por PCR em tempo real, no equipamento GeneXpert® System, da Cepheid® (pesquisa dos genes VanA e VanB).

Exsudado retal: para *screening* de *Enterobacteriales* produtoras de carbapenemases.

Disponível para doentes de risco, doentes da UCIP e doentes contactantes de casos positivos. Feito por PCR em tempo real, no equipamento GeneXpert® System, da Cepheid® (pesquisa das carbapenemases KPC, OXA-48, NDM, VIM, IMP).

10. LCR

Perante a suspeita de uma meningite a análise do LCR é imperativa. Pode ser causada por múltiplos MO (bactérias, vírus e fungos) sendo de particular gravidade. O diagnóstico célere e o início da terapêutica dirigida são fundamentais. Os MO mais frequentemente isolados no SPC do CHMT são: *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* ou *Streptococcus pneumoniae*.

Colheita e processamento

A colheita de LCR é feita por punção lombar em condições de assepsia. Tratando-se um líquido estéril, qualquer MO aqui detetado será sempre valorizável. O tratamento desta amostra deve ser feito o mais rapidamente possível, não devendo ser sujeita a variações de temperatura.

Procede-se à centrifugação a 1500 rpm durante 10 minutos, antes da sementeira, para concentrar a amostra. Se a quantidade da amostra for inferior a 1 mL, esta não se centrifuga. A partir do sedimento faz-se a lâmina para a coloração de Gram e inoculam-se, por inundação, os meios de COS, PVX e BHI, com incubação a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, 18-24h. A passagem do BHI para os meios sólidos ocorre quando aquele se apresentar turvo ou, caso tal não suceda, às 72h.

Dadas as múltiplas etiologias possíveis e a necessidade de rapidez da resposta, procede-se ao diagnóstico sindrómico, por PCR, de todas as amostras de LCR, no equipamento BioFire FilmArray® (Painel Sistema Nervoso Central, que detecta 14 MO diferentes – descrito no Quadro C abaixo).

Bactérias	Vírus
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Escherichia coli</i> K1 • <i>Haemophilus influenzae</i> • <i>Listeria monocytogenes</i> • <i>Neisseria meningitidis</i> • <i>Streptococcus agalactiae</i> • <i>Streptococcus pneumoniae</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Cytomegalovirus (CMV) • Enterovirus • Herpes simplex virus 1 (HSV-1) • Herpes simplex virus 2 (HSV-2) • Human herpes virus 6 (HHV-6) • Human parechovirus • Varicella zoster virus (VZV)
Fungos	
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Cryptococcus neoformans/gattii</i> 	

Quadro C - Painel Sistema Nervoso Central do FilmArray™ (72).

Resultados

Independentemente do resultado da PCR, o Gram e as culturas são sempre valorizados nomeadamente para a obtenção de TSA.

MICOBACTERIOLOGIA

Diariamente chegam ao SPC diferentes amostras com pedido de pesquisa de micobactérias. Estas amostras podem ser: amostras respiratórias (lavado broncoalveolar, aspirado brônquico, expetoração, secreções), aspirado gástrico, líquidos (pleural, sinovial, ascítico, LCR), urina, pus, e sangue.

O processamento das amostras ocorre numa sala específica com a câmara de fluxo laminar de nível II e o equipamento BACTEC™9000MB, necessário à incubação destas.

Amostras provenientes do trato respiratório (expetorações ou secreções) carecem de tratamento prévio antes da sua inoculação: liquefação e descontaminação. Para estes procedimentos utiliza-se BBL™ MycoPrep™ Reagent Reagent (solução de digestão e descontaminação), constituído por NaOH a 2% combinado com N-acetil-L-cisteína (agentes mucolíticos) (73). Deixar repousar as amostras durante 15 minutos (para digerir e descontaminar) e centrifugar a 3000 rpm, 15 minutos.

Amostras líquidas não estéreis apenas são descontaminadas e posteriormente concentradas por centrifugação. As amostras de líquidos estéreis apenas são concentradas por centrifugação (exceto quando a quantidade do produto é diminuta, inoculando-se a sua totalidade).

Para todas as amostras não estéreis utiliza-se o *PANTA/F BACTEC* (mistura de antimicrobianos para eliminar os MO que tenham sobrevivido à descontaminação prévia). O *Suplemento/F BACTEC* (para favorecer o crescimento do *Mycobacterium tuberculosis*) é adicionado a todas as amostras. Após a preparação adequada de cada tipo de amostra é feita a inoculação em Frascos de Cultura *BACTEC™ MYCO/F-Sputa* (Middlebrook 7H9) e um esfregaço que é fixado pelo calor e corado pela Auramina O.

A incubação e a monitorização das amostras são automatizadas e contínuas no equipamento *BACTEC 9000MB*, a 37°C. Havendo multiplicação dos MO, verifica-se um aumento de consumo de O₂ com correspondente aumento da produção de CO₂ assim como da fluorescência, sendo esta detetada pelo sensor presente no equipamento ⁽⁷⁴⁾. Esta positividade, gera um alerta que é transmitido para o *Modulab*.

Quando surge o alerta de positividade no equipamento é feito um esfregaço a partir do meio líquido fixado com metanol e corado pela coloração Kinyoun (ou Ziehl Neelsen modificado). É importante a observação da lâmina para se fazer a distinção entre contaminação e presença efetiva de BAAR – estes coram de vermelho (num fundo azul). Caso se verifique contaminação, a amostra é novamente descontaminada e reincubada. Se se observarem BAAR no esfregaço pesquisa-se a presença da proteína MPT64 (secretada apenas por *M. tuberculosis*) por teste imunocromatográfico *SD Bioline TB Ag MPT64 Rapid (Alere™)*. Se o resultado for positivo o frasco é enviado para o INSA para ser feito o TSA. Se o resultado for negativo, pode-se estar perante uma micobactéria não tuberculosa (MNT), devendo o frasco ser também enviado para o INSA para identificação e eventual TSA, de acordo com a natureza da amostra, critérios clínicos e imagiológicos.

Conclusão

O mestrado em análises clínicas surge numa fase de mudança na minha vida. Farmacêutica há 8 anos, 6 dos quais em farmácia comunitária, decidi mudar o rumo do meu percurso profissional enveredando pelas Análises Clínicas. Com o objetivo da Especialidade em Análises Clínicas pela Ordem dos Farmacêuticos, senti que este Mestrado era fulcral para esta nova etapa.

A área das análises clínicas é um mundo muito vasto e complexo, com uma panóplia de parâmetros que se podem determinar e que estão em constante atualização.

Sem dúvida que esta área é imprescindível para se poder fazer um diagnóstico correto, constituindo um dos mais valiosos meios complementares de diagnóstico.

O estágio permite obter uma visão geral da importância das análises clínicas, do papel fundamental quer dos Médicos/TS quer dos TSDT na obtenção de resultados confiáveis.

É sem dúvida uma mais valia, permitindo ganhar experiência laboratorial, criar métodos de trabalho e rotinas.

Este Mestrado permitiu rever conceitos e adquirir novos conhecimentos. Sinto-me mais preparada e confiante depois deste Mestrado e Estágio para enfrentar os desafios a que me propus, tendo sempre em mente que a aprendizagem é contínua. O futuro começa agora!

Referências Bibliográficas

1. Fonte: <http://www.chmt.min-saude.pt/instituicao/> - 16.03.2020
2. Ordem dos Farmacêuticos e Associação Portuguesa de Analistas Clínicos. **Normas para o Laboratório Clínico**. *Sistema de Gestão Da Qualidade Para Os Laboratórios Clínicos*, (3ª Edição). ISBN 978-989-98069-7-9 (versão digital), 2016.
3. CHMT. Protocolo. **Crítérios de Rejeição de Requisição e de Amostras Biológicas**. PT.SPC.002.04 (2014).
4. NUNES, Baltazar. SILVA, Susana – **Controlo da qualidade: Noções de estatística aplicada ao Controlo da Qualidade interno**. In 2º Congresso de Controlo de Qualidade Laboratorial para Países de Língua Portuguesa, 2017.
5. Manual de Boas Práticas Laboratoriais. Ordem dos Farmacêuticos. 2001. Disponível em: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/manual_de_boas_praticas_laboratoriais_rev_12816431035b2a3ccb1ab78.pdf (10.10.2020)
6. ALMEIDA, Carla – **Controlo de Qualidade Interno: Elaboração de um programa de Controlo de Qualidade Interno segundo as boas práticas da Qualidade**. Obtenção do título de Mestre em Organização e Qualidade no Laboratório de Análises Clínicas pela Universidade Atlântica e pela Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa, 2013.
7. Ordem dos Farmacêuticos. Instrução de trabalho – **Controlo da qualidade**. Fonte: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/documentos/detalhes.php?id=335>. (10.10.2020).
8. CHMT. Instrução de trabalho. **Controlo de Qualidade Interno e Testes de Identificação e Suscetibilidade aos Antibióticos em Equipamento Automático**. IT.SPC.045.02. 2017.
9. KINDT, Thomas J.; GOLDSBY, Richard; OSBORNE, Barbara A – **Kuby Immunology**. 6ª Ed. New York. W.H. Freeman, 2007. ISBN: 1429202114.
10. FARIA, Rosa Malena D.; SILVA, Roberta O. Paula (2007) – **Gamopatias monoclonais – critérios diagnósticos e diagnósticos diferenciais**. In Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 2007. 29(1), 17–22.
11. ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv – **Imunologia Celular e Molecular**. 8ª Ed. Elsevier, 2015.
12. Fonte: <http://www.doencasdofigado.com.br/Autoimunidade.pdf>. (28.09.2020)
13. LORENZI, Therezinha F. – **Manual de hematologia: propedêutica e clínica**. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, MEDSI, 2006. ISBN - 8527712377.

14. FAILACE, Renato – **Hemograma - Manual De Interpretação**. 5ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2009.
15. MATSUSHITA, Hiromichi *et al.* – **Clinical Case Report**. Sysmex, XN-Series - Automotated Hematology Analyser. Volume I. Kobe, Japan. 2016.
16. HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. – **Fundamentos em Hematologia**. 6ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
17. FERREIRA, Ana B *et al.* – **Coloração de May-Grünwald Giemsa em amostras de secreções brônquicas processadas em ThinPrep®: comparação de três métodos de pós- processamento**. In Revista Técnica de Anatomia Patológica. Edição nº 17, 2013.
18. Fonte: <https://document.onl/documents/esfregaco-sanguineo-e-coloracao-universidade-o-sanguineo-e-coloracao-prof.html> (01.10.2020)
19. LÖFFLER, Helmut; RASTETTER, Johann; HAFERLACH, Torsten – **Atlas of Clinical Hematology**. 6ª Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2005. ISBN: 3642059066.
20. LEWIS, S. M.; BAIN, B. J.; BATES, I. **Hematologia prática de Dacie e Lewis**. 9ª Ed. Brasil, Porto Alegre: Artmed, 2006.
21. SOARES, Anna L.; SANTOS, Elcivane A – **Velocidade de hemossedimentação : comparação entre o método Microtest X (microsedimentação) e o método de referência Westergren**. In Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 31(1), 47–50, 2009.
22. McPHERSON, Richard, PINCUS, Matthew – **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 22ª Ed. St. Louis, MO: Elsevier, 2011. ISBN-1437709745.
23. PINTO, Anabela Mota – **Fisiopatologia Fundamentos e Aplicações**. 1ª Ed. Lisboa: Lidel, 225–226, 2007.
24. Ficha técnica do equipamento Alifax Test I THL.
25. GALE, Andrew J. – **Current Understanding of Hemostasis** - NIH Public Access. Author manuscript; Available in PMC 2011. Published in final edited form as: *Toxicol Pathol*; 39(1): 273–280, 2011.
26. FERREIRA, Cláudia Natália *et al.* – **O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações**. In Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 32(5): 416-421, 2010.
27. Fonte: https://www.centerlab.com/blog/Centernews_107/ 10.10.2020

28. MILOS, M. *et al.* – **Evaluation and performance characteristics of the coagulation system: ACL TOP analyzer – HemosIL reagents.** International Journal of Laboratory Hematology. 31(1) 26-35, 2009.
29. ACL TOP 500 - HemosIL® **RecombiPlasTin 2G** – Ref 0020003050. 2019.
30. WHO Expert Committee on Biological Standardization. **Guidelines for thromboplastins and plasma used to control oral anticoagulant therapy with vitamin K-antagonists - Expert Committee on Biological Standardization.** 979, 271–316, 2013.
31. ARIF, Khan Md; RAHMAN, Mohammad Ashiqur – **A Review of Warfarin Dosing and Monitoring.** In Faridpur Medical College Journal, 13(1), 40–43, 2018.
32. TIMÓTEO, Ana Teresa; PAIS, Maria João – **Anticoagulação na prática clínica. Iª parte – anticoagulação oral.** In Medicina Interna – Artigo de Revisão. Lisboa. Volume 5, N°3, 194-200, 1998.
33. BAKLAJA, R.; Pešić, M. Č.; Czarnecki, J.– **Hemostasis and hemorrhagic disorders.** 2ª Ed. Bad Harzburg, Germany: Fermentation-Biotec GmbH, 2008. ISBN- 9783000258268.
34. AZEVEDO, Waldeneide F. *et al.* – **Fibrinogen: cardiometabolic risk marker in obese or overweight children and adolescents.** In Jornal de Pediatria (Versão Em Português). Rio de Janeiro. 91(5), 464–470, 2015.
35. ACL TOP 500 - HemosIL® **Q.F.A. Thrombin (Bovine)** – 0020301800. 2018
36. CHANDLER, Wayne L. *et al.* – **Handbook of diagnostic hemostasis and thrombosis tests.** 3ª Ed. University of Washington, Department of Laboratory Medicine, 2005.
37. BAS DE LAAT, Xiao-Xuan Wu *et al.* – **Correlation between antiphospholipid antibodies that recognize domain I of β 2-glycoprotein I and a reduction in the anticoagulant activity of annexin A5.** In Journal of the American Society of Hematology. Washignton DC, 109:1490-4, 2006.
38. MARLAR, Richard A; HUSAIN, Sanam – **The enigmas of the lupus anticoagulant: mechanisms, diagnosis, and management.** Current Rheumatology Reports. 10(1): 74-80, 2008.
39. MORESCO, Rafael Noal – **Associação entre os níveis de D-dímero, produtos de degradação da fibrina/fibrinogénio (PDF) e troponina cardíaca T na investigação dos distúrbios tromboembólicos.** Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Tese de Doutorado. 2005
40. ACL TOP 500 - HemosIL® **D-Dimer HS 500** - 0020500100. 2018

41. CHMT. Manual – **Colheitas de Produtos para Estudo Microbiológicos**. MN.SPC.002.00. 2014.
42. FONSECA, Ana Bruschy *et al.* – **Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia**. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge/Programa Nacional de Controlo de Infecção, 2004.
43. TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. – **Microbiologia**. 10^a Ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. ISBN 978-85-363-2698-6.
44. Aerospray[®] Gram 7322 – **Applications Manual**.. Utah, Usa: ELITechGroup Inc, 2015.
45. MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. – **Microbiologia médica**. 6^a Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
46. BioMérieux. Meio ureia indol (UI-F) (Ref 55752). 2009.
47. CHMT. Instrução de trabalho. **Prova de Sensibilidade à Optoquina**. IT.SPC.041.00. 2014.
48. Oxoid. **E. coli O157 Latex Test** (Ref DR0620M). 2013.
49. Oxoid. **Dryspot™ Pneumo Test** (Ref DR0420M). 2013.
50. AlereTM. **Clearview[®] Exact Strep A Cassette** (Ref CV506758C). 2005.
51. AlereTM. **BinaxNOW[®] Streptococcus pneumoniae** (Ref 710-000). 2017.
52. Coris BioConcept. **Legionella K-SeT** (Ref K1515). 2014.
53. R-biopharm. **RIDA[®]QUICK Clostridium difficile GDH** (Ref N0703). 2013.
54. R-biopharm. **RIDA[®]QUICK Clostridium difficile toxina A/B** (Ref N0803). 2010.
55. R-biopharm. **RIDA[®]QUICK Campylobacter** (Ref N2403). 2012.
56. R-biopharm. **RIDA[®]QUICK Rotavirus/Adenovirus Combi** (Ref N1003). 2010.
57. I54. AlereTM. BinaxNOW[®] RSV (Ref 430000). 2015.
58. Cepheid[®]. GeneXpert[®] System Flu (Ref GXFLU-CE-10). 2015.
59. Cepheid[®]. GeneXpert[®] System HPV (Ref GXHPV-CE-10). 2014.
60. <https://techlib.biomerieux.com/> (09.10.2020)
61. MAHON, Connie R.; LEHMAN, Donald C.; MANUSELIS, George – **Textbook of Diagnostic Microbiology**. 5^o Ed. New York: Saunders, 2014. ISBN: 0323089895.
62. LOPES, Hélio Vasconcellos; TAVARES, Walter – **Diagnóstico das infecções do trato urinário**. In Revista Da Associação Médica Brasileira. São Paulo, Vol. 51, N^o6, 2005.
63. COLLEE, J. G. *et al.* – **Microbiologia Médica**. 6^a Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1993. ISBN- 9789723104165.
64. CHMT. Folheto. **Preparação para Colheita de Sangue para Hemoculturas**. FLT.SPC.003.00. 2017.

65. PINA, Elaine *et al.* – **Recomendações para a prevenção da infeção associada aos dispositivos intravasculares.** Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge/Programa Nacional de Controlo de Infeção, 2006.
66. <https://www.biomerieux.com.br/recursos/healthcare-information/gastro-intestinal-infections> (10.10.2020).
67. BD BBL **CultureSwab Plus.** Meio líquido de Stuart, Meio Líquido de Amies, Meio de Cary-Blair. 2011. Disponível em: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=14476> (12.10.2020).
68. Heejung, Kim *et al.* – **Evaluation of a Rapid Membrane Enzyme Immunoassay for the Simultaneous Detection of Glutamate Dehydrogenase and Toxin for the Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection.** In *Annals of Laboratory Medicine.* Seoul, Korea: 34: 235-239, 2014.
69. ZEIBIG, Elizabeth A – **Clinical Parasitology: A clinical approach.** 2ª Ed. Local: Saunders, 2013. 80-85. ISBN- 1416060448.
70. <https://www.cdc.gov/parasites/pinworm/epi.html> (11.10.2020).
71. FERNANDES, Sofia *et al.* – **Protocolo de parasitoses intestinais.** In Sociedade Portuguesa de Pediatria Consensos e Recomendações. *Acta Pediátrica Portuguesa.* 43(1): 35-41, 2012.
72. <https://www.biomerieux.com.br/produto/filmarrayr-meningitisencephalitis-me-panel> (12.10.2020).
73. BBL® MycoPrep™ – **Specimen Digestion/Descontamination Kit For Processing of Mycobacterial Specimens.**
Disponível em: <https://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/clsi/clsi-MYCOPREP.pdf> (12.10.2020).
74. BD Bactec™ – **Myco/F-Sputa Culture Vials (Ref 442187).** 2015.
75. <https://sites.google.com/site/254512/Home/microbiologia-I/Microbiologia-Veterinaria/bacteriologia-veterinaria/procedimento-para-a-realizacao-de-antibiograma> (12.10.2020).

ANEXOS

Anexo I

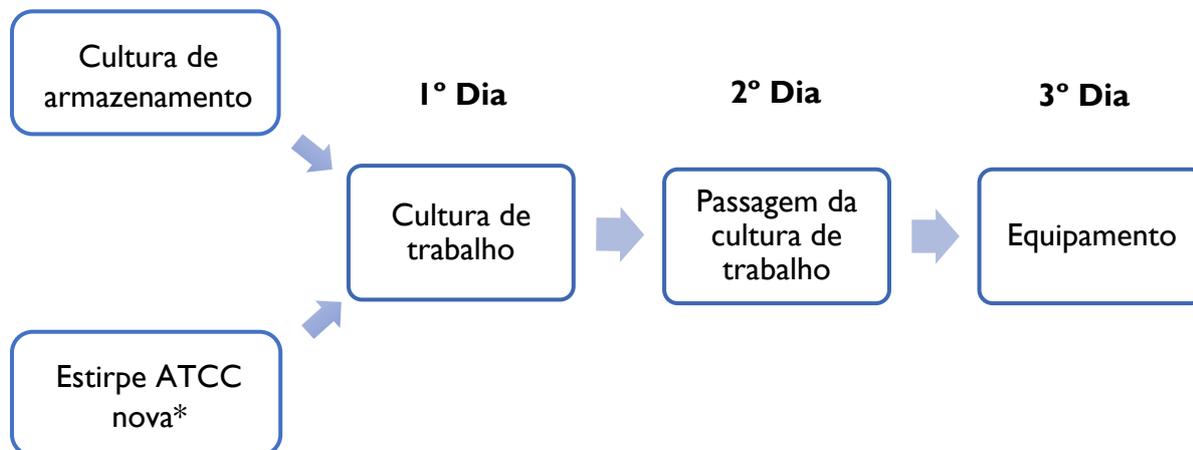
Tabela I – Plano do CQI do setor de Hematologia

Equipamento	CQI	Parâmetros controlados	Periodicidade
Sysmex XN-1000TM	XN CHECK™ (Níveis 1, 2 e 3)	Hemogramas	Diariamente no início do turno da manhã
	XN CHECK™ BF (Níveis 1 e 2)	Líquidos biológicos	Quanto há pedido
Alifax Test I THL	Latex Test Tube (Níveis 1, 2 e 3)	VS	1 vez por semana (5ªfeira)
STA Compact Max®	System Control (Níveis 1e 2)	TP, aPTT, INR	Diariamente no início do turno da manhã
		Fibrinogénio	Só quando há pedido
		Coagulação especial	
	Controlo TT (Nível 1) + Nível normal do System Control	TT	Só quando há pedido
	Control LA (Níveis 1 e 2)	Anticoagulante Lúpico	
Liatest Control (Nível normal e patológico)	D-Dímeros	Diariamente no início do turno da manhã	
Arkray Adams A1c HA-8160, da A. Menarini Diagnostics	2 níveis de controlo	HbA e HbF	No início do turno: 2ª, 4ª e 6ªf.
	Eurotrol 2 níveis	Doseamento de Hb	Só quando há pedido
HYDRASYS, da Sebia	Hb AFCS HbA2	Eletroforese das hemoglobinas	Só quando há pedido

VS: velocidade de sedimentação; TP: tempo de protrombina; aPTT: tempo de tromboplastina parcial ativada; TT: tempo de trombina; Hb: hemoglobina

Anexo 2

A – Manipulação de estirpes ATCC



*Apenas quando não houver culturas de armazenamento.

A- Manipulação de estirpes ATCC.

B – Calendário do CQI da Microbiologia

Tabela II – Estirpes bacterianas disponíveis (manipuladas semanalmente de acordo com a ordem estabelecida) e o seu respetivo teste ID e TSA (executados no equipamento automático – Vitek®2)

Estirpes Bacterianas	Cartas Vitek® 2
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	Carta GP TSA para <i>Enterococcus</i>
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	Carta GN TSA para Enterobactérias
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC49619	Carta GP TSA para <i>S. pneumoniae</i> TSA para <i>Streptococcus</i> spp.
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213	Carta GP TSA para <i>Staphylococcus</i> spp.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	Carta GN TSA para <i>Pseudomonas</i>

ATCC: American Type Culture Collection; TSA: teste de suscetibilidade aos antimicrobianos; GP: Gram positivo; GN: Gram negativo.

Anexo 3

Tabela III – Avaliação Externa da Qualidade no SPC-CHMT 2020.

SECÇÃO	PROGRAMAS (EnsaioXAmostras/Ano)			
	INSA/Labquality/ECAT	RIQAS	UK NEKAS/Instand	EUROIMMUN
HEMATOLOGIA	Morfologia Sangue Periférico e Contagem Diferencial Leucocitária (3x3) Hemoglobinopatias (3x3) D-Dímeros (2x2) Reticulócitos (2x2) VS (2x3)	Contagem Celular (Hemograma) (12X1) Coagulação com D-Dímeros (12x1) Hgb Glicada (12x1)	Antocoagulante Lúpico (2x1)	
IMUNOQUÍMICA	Urina: Química Quantitativa (4x1) Alergologia (4x3) Proteínas Específicas (3x2) Electroforese das Proteínas (4x2) Ac anti-tiroideus (2x2) Doença celíaca (2x2) FR e CCP (2x2)	Marcadores Cardíacos (12x1) Química Clínica (12x1) Imunoensaio (12x1) Gasometria (12x1) Amónia e Etanol (12x1) LCR (12x1)		ANA e ENA (2x3) Tecidos (2x3) ANCA's (2x3)
MICROBIOLOGIA	Morfologia Parasitária (3x4) Morfologia Parasitária Sangue (virtual) (1x2) Morfologia Parasitária Fezes (virtual) (2x3) Micologia (4x3)		Bacteriologia Geral (12x5) <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (2x5) Carbapenemases BM (1x4) <i>C. difficile</i> BM (1x4) HPV BM (1x5) <i>M.tuberculosis</i> BM (1x5) MRSA BM (1x4) VRE BM (1x4)	
SEROLOGIA INFECCIOSA	Ac Rubéola (4x5) Ac Toxoplasmose (4x5) <i>Ac. Borrelia burdorferi</i> (4x2) Ac CMV (4x5) Ac EBV (4x3) Ac VZV (4x3)			

Anexo 4

Tabela IV – Equipamentos e respetivo método analítico utilizados na determinação de parâmetros analíticos de Química Clínica.

Equipamento	Metodologia	Parâmetros Analíticos
Unicel DxC 800 Synchron	Potenciometria indireta, Turbidimetria, colorimetria	Sódio (Na ⁺) Potássio (K ⁺) Cloro (Cl ⁻) Cálcio (Ca ²⁺) Fósforo (P), Magnésio (Mg ²⁺) Ureia Creatinina Glicose Albumina Proteínas totais no soro Proteínas totais na urina ALP ALT AST Bilirrubina Direta Bilirrubina Total GGT AMY PCR CH50 Colesterol Total Colesterol HDL Triglicéridos LDH Ferro Ácido Úrico CK CK-MB Colinesterase Lipase Digoxina Carbamazepina Fenitoína Teofilina Etanol Ácido Valpróico (Valproato) Lítio TASO ADA Acetaminofeno
Aution Max AX-4280	Refletância, índice de refração, dispersão de luz	Urina Tipo II Densidade Cor Turvação Glicose Bilirrubina (pigmentos biliares) Proteínas pH Hemoglobina Corpos cetónicos (cetonas) Urobilinogénio, Nitritos Esterase Leucocitária (leucócitos)

ALP, Fosfatase Alcalina; ALT, Alanina Aminotransferase; AST, Aspartato Aminotransferase; GGT, Gama Glutamil Transferase; AMY, Amilase; PCR, Proteína C Reativa; CH50, Atividade Total do Complemento; HDL-Lipoproteína de alta densidade; LDH - Lactato Desidrogenase; CK-Creatinase; CK-MB- Creatinase fração MB; TASO -Título Antiestreptolisina O; ADA – adenosina desaminase.

Anexo 5

Tabela V – Técnicas de serologia manual e patologias associadas, realizadas no SPC.

Reação	Patologia associada
Pesquisa de <i>Ac. Echinococcus granulosus</i>	Hidatidose
Reação de Huddleson/Wright	Brucelose
Reação de Rosa Bengala	Brucelose
Reação de Paul-Bunnell	Mononucleose Infecciosa (EBV)
Reação de Waller-Rose	Artrite Reumatoide (Fator Reumatoide)
Reação de Weil-Félix	Febre Escaro Nodular - <i>Ricketzia conorii</i>
Reação de Widal-Félix	Febre tifóide - <i>Salmonella tiphy</i>

Anexo 6

Tabela VI – Equipamentos e respetivo método analítico utilizados na determinação de parâmetros analíticos de Imunologia.

Equipamento	Metodologia	Parâmetros analíticos
Unicel DxI 800 Synchron	Quimioluminescência (Imunoensaio quimioluminiscente)	Ferritina Ácido Fólico Vitamina D Vitamina B12 iPTH ATG ATPO Fosfatase alcalina óssea
		Hormonas da fertilidade
		Estradiol Progesterona LH FSH Prolactina
		Hormonas tiroideias
		T3 livre T4 livre T3 total T4 total TSH Ac. anti-Tg Ac anti-TPO Tiroglobulina
		Marcadores tumorais
		CEA CA 19-9 CA 15-3 CA 125 α -fetoproteína β 2 Microglobulina PSA total PSA livre
		Cadeias leves Kappa (K) Cadeias leves Lambda (λ) Relação cadeias K/ λ Complemento C1q Inibidor da esterase C1

Image 800	Turbidimetria Nefelometria	C3 C4 α I Anti-tripsina Ceruplasmina IgG - subclasse IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 IgE total Lp (a) Apolipoproteína A1 Apolipoproteína B Fator Reumatóide Homocisteína Eritropoeitina Haptoglobina
VIDAS®	<i>Enzyme Linked Fluorescent Assay (ELFA)</i> (Sanduíche e Captura de IgM)	Anticorpos Anti: <i>Toxoplasma gondii</i> IgG e IgM Vírus da rubéola IgG e IgM CMV IgG e IgM EBV- VCA IgG e IgM EBV-EBNA IgG <i>Borrelia burgdorferi</i> IgG e IgM
ImmunoCAP™ 250	Imunoensaio fluoroenzimático (FEIA)	Alergias
		Rastreio de Alergénios inalantes (Phadiotop)
		Alergénios de Rastreio
		Multi-rast alimentar Multi-rast aves Multi-rast árvores Multi-rast gramíneas Multi-rast ervas infestantes Multi-rast fungos
		Precipitinas
		<u>Aviárias</u> (aves de capoeira, gaiola, periquito, pombo, <i>Aspergillus fumigatus</i>)
		Alergénios Alimentares
Ovo, leite e derivados (clara de ovo, gema de ovo, ovalbumina, ovomucoide, leite, α - lactoalbumina, β - lactoalbumina, caseína) Peixes (bacalhau, camarão, pescada)		

		<p><u>Carnes</u> (carne de porco, carne de vaca)</p> <p><u>Frutos</u> (laranja, morango)</p> <p><u>Sementes e Frutos Secos</u> (amendoim, caju, glúten, soja, trigo)</p> <hr/> <p>Alergénios Inalantes Específicos</p> <hr/> <p><u>Árvores</u> (álamo, faia, choupo, <i>Eucalyptus spp</i>, oliveira, pinheiro manso, plátano, videiro)</p> <p><u>Epitélios de animais</u> (caspa de cão, cavalo, gato)</p> <p><u>Ácaros</u> (<i>Dermatophagoides farinae</i>, <i>Dermatophagoides pteronysinus</i>, <i>Lepidoglyphus</i>)</p> <p><u>Ervas infestantes</u> (<i>Ambrosia trifida</i>, <i>Artemisia vulgaris</i>, <i>Chenopodium álbum</i> (pé de ganso), <i>Parietaria offinalis</i>, <i>Parietaria judaica</i>)</p> <p><u>Gramíneas</u> (azevém, grama, panasco, pólen de aveia, centeio, cevada e trigo, rabo- gato)</p> <p><u>Outros</u> (pó da casa, <i>Aspergillus fumigatus</i>, <i>Alternaria alternata</i>, látex)</p> <hr/> <p>Autoimunidade</p> <hr/> <p>Ac. Anti MBG Ac. Anti-Cardiolipina (IgM/IgG) Ac. Anti-Beta-2 Glicoproteína I Ac. Anti-CCP AMA-2 Ac. Anti-LKM Ac. Anti-Fator Intrínseco Ac. Anti-Histonas Ac. Anti-Gliadina IgA Ac. Anti-Gliadina IgG Ac. Anti-Transglutaminase IgA ASCA Calprotectina Fecal</p>
--	--	---

		<p>Ac. Anti-dsDna</p> <p>Ac. Anti-Jo1 Ac. Anti-RNP Ac. Anti-Scl 70 Ac. Anti-Sm Ac. Anti-SSA/Ro60 Ac. Anti-SSB/La Ac. Anti Centrômero B</p> <p>(testes confirmatórios com doseamentos)</p> <p>Fármacos</p> <p>Penicilina G, c1 Penicilina V, c2</p> <p>Outras Provas</p> <p>Triptase</p>
Hydrasys	Eletroforese em gel de agarose	Eletroforese de proteínas séricas Imunofixação sérica (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE)
MAGO 4	<p>Imunofluorescência Indireta (IFI)</p> <p>Imunoensaio Enzimático (ELISA)</p>	<p>ANA ANCA ASMA APCA Ac. Anti-Fosfolípidos (IgM/IgG) (IgM/IgG) Ac. anti <i>Chlamydophila pneumoniae</i> (IgG,IgM) Ac anti <i>Mycoplasma pneumoniae</i> (IgG,IgM) Sarampo IgG Ac. anti Toxoide Tetânico (IgG) Ac. anti Toxoide Diftérico (IgG)</p>
Maglumi 800	Quimioluminescência	<p>Marcadores Tumorais</p> <p>CA 72.4 Cyfra 21.1 SCCA NSE</p> <p>Hormonologia</p> <p>Testosterona total Testosterona livre Hormona anti-Mülleriana Insulina IAA GAD65</p>

		Gastrina Péptido C Aldosterona GH IGF-I DHEA-S 17-OHPRG ACTH Renina Calcitonina TRab
		Fármacos
		Ampicilina, c5 Amoxicilina, c6
		Serologia
		Ac. anti <i>Herpes simplex</i> I/II (IgG, IgM)

iPTH- Paratormona intata; ATG- Anticorpo Anti Tiroglobulina; ATPO- Anticorpo Anti Peroxidase; ; LH- Hormona Luteinizante ; FSH- Hormona Estimuladora do Folículo; ; T3- triiodotironina; T4- tiroxina TSH- Hormona Estimuladora da Tireoide; CEA – Antígeno carcinoembrionário; CA 19.9- Antígeno carboidrato 19.9; CA 15.3- Antígeno carboidrato 15.3; CA 125- Antígeno carboidrato 125; PSA- Antígeno Específico da Próstata; Complemento C1q – componente complemento Iq; C3- Proteína complemento; C4- Proteína Complemento; IgG- Imunoglobulina G; IgE- Imunoglobulina E; Lp (a) – Lipoproteína; CMV- Citomegalovírus; EBV-VCA - Vírus Epstein Barr – antígeno viral da cápside; Ac Anti-MBG – anticorpo anti-membrana basal glomerular; Ac anti-CCP- Anticorpo Anti Péptido Citrunado Cíclico; AMA – Anticorpo Anti Mitocôndria; Ac. anti-LKM – anticorpos anti fração mitocondrial de fígado e rim; ASCA – Anticorpo Anti *Saccharomyces cerevisiae*; ; Ac. Anti-dsDNA – Ac anti Ácido Desoxirribonucleico cadeia dupla; Ac Anti-Jo-1 – autoanticorpo antisintetase; RNP – anticorpo contra a fração nuclear das ribonucleoproteínas; Ac. Anti-Scl 70 – anticorpos anti-enzima DNA topoisomerase I; Ac Anti-Sm – anticorpo antígeno Nuclear Smith; Ac Anti-SSa/Ro60 – anticorpo anti-antígeno Ro; Ac Anti-SSB/La – anticorpo anti-antígeno La; ANA- Ac. Antinucleares; ANCA- Ac. Anti Citoplasma do Neutrófilo; ASMA – Ac. Anti Músculo Liso Actina; APCA – ac. Anti Células Parietais Gástricas; CA 72.4 - Antígeno carboidrato 72.4; CYFRA 21.1 – Fragmento da Citoqueratina 19; SCCA - Antígeno do Carcinoma de Células Escamosas SCCA; NSE- Enolase Neuro Específica; IAA – Anticorpo anti-insulina; GAD – anticorpo anti-descarboxilase do ácido glutâmico; GH – hormona do crescimento; IGF-I- Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I ou somatomedina C; DHEA-S – sulfato de dehidroepiandrosterona; 17-OHPRG - 17-hidroxiprogesterona; ACTH- Hormona Adrenocorticotrópica; TRab - Anticorpos anti-recetores de TSH.

Anexo 7

Tabela VII –Exemplos de doenças autoimunes sistêmicas e Ags (Self) correspondentes.

Doença Autoimune Sistêmica	Antigénio (Ag Self)
Lúpus Eritematoso Sistémico (LES)	ADN, proteínas nucleares, membranas dos eritrócitos e plaquetas.
Síndrome Sjögren	Glândulas salivares, fígado, rim, tiróide
Artrite Reumatóide (AR)	Tecido conetivo
Esclerose Múltipla (EM)	Cérebro e matéria branca
Esclerodermia	Coração, pulmão, rim, trato gastrointestinal

ADN - ácido desoxirribonucleico

Anexo 8

Tabela VIII – Exemplos de doenças autoimunes específicas de órgão, órgão-alvo e principais Acs envolvidos na patologia que desencadeia.

Órgão	Anticorpo (Ac)	Patologia Associada
Fígado	ANA, ASMA, AMA M2, gp 210, Sp100	Hepatite autoimune, tipo I Cirrose Biliar Primária
Músculo	Recetores da acetilcolina	<i>Myasthenia Gravis</i>
Intestino	Endomísio Transglutaminase IgG, IgA Gliadinas IgG, IgA	Doença Celíaca

ANA, Anticorpos Antinucleares; ASMA, Anticorpos Anti Musculo Liso; AMA M2, Anticorpos Anti Mitocôndria fração M2; gp210, Glicoproteína de 210 KDa; Sp 100, Proteína ácidosolúvel de 100 KDa; IgG, Imunoglobulina G; IgA, Imunoglobulina A

Anexo 9

Tabela IL – Resumo do método e correspondentes parâmetros medidos no Sysmex XN-1000™.

Método	Parâmetros Medidos
Focagem hidrodinâmica com detecção por impedância elétrica	- Contagem de eritrócitos (RBC) - Plaquetas (PLT)
Lauril Sulfato de Sódio (SLS, do inglês <i>Sodium Lauryl Sulfate</i>)	- Doseamento da Hb
Citometria de fluxo de fluorescência	- Contagem diferencial de leucócitos (WBC) - Contagem total WBC e eritroblastos - Reticulócitos
Derivados de histogramas	- RDW e PDW
Acumulação da altura dos impulsos dos eritrócitos num volume fixo	- HCT
Calculados (<i>software</i>)	-HCM, CHCM, VCM

Anexo 10

Tabela X – Valores de referência para os parâmetros estudados.

Parâmetro	Valor de referência	Unidade
RBC	♂ 4.5 - 5.5 ♀ 3.8 - 4.8	$10^{12}/L$
Conc. de Hb	♂ 13 - 18 ♀ 12 - 15	g/dL
VCM	85 - 95	fL
RDW	11,5 - 14,5	%
HCT	♂ 40 - 50 ♀ 36 - 46	%
HCM	27 - 32	pg
CHCM	32 - 36	g/dL
Reticulócitos	0,5 - 1,5	%
Plaquetas	150 - 400	$10^3/\mu L$

Anexo II

Descrição dos diferentes meios de cultura utilizados no SPC – CHMT.

BHI – Caldo Coração Cérebro, do inglês *Brain Heart Infusion*

É um meio de enriquecimento composto por uma base nutritiva de coração e cérebro.

Classificação: Meio líquido de enriquecimento não seletivo ⁽⁶⁰⁾.

Selenito – Caldo Selenito

É utilizado para as coproculturas. A presença de selenito inibe a maioria das *Enterobacteriales*, incluindo algumas estirpes de *Shigella* spp e bactérias Gram-positivo, fazendo deste princípio a seletividade deste meio. A subcultura para meios sólidos deve ocorrer entre 6-12h, que corresponde ao prazo médio da inibição de outras estirpes, como o *Proteus* spp.

Classificação: Meio líquido de enriquecimento seletivo para *Salmonella* spp ⁽⁶⁰⁾.

COS – Gelose de Columbia +5% de Sangue de Carneiro (vulgarmente, gelose de sangue)

É um meio rico e nutritivo, complementado com sangue desfibrinado de carneiro, permitindo a observação ou não de hemólise e o tipo de hemólise (alfa, beta e gama). A presença ou não de hemólise é um critério básico para a identificação de algumas bactérias, como é caso dos *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp.

Classificação: Meio sólido não seletivo ⁽⁶⁰⁾.

CNA – Gelose COS com ácido nalidíxico e colistina

Este meio rico tem na sua constituição antimicrobianos que servem que inibem o crescimento da grande maioria das bactérias de Gram-negativo.

Classificação: Meio sólido seletivo para Gram positivo ⁽⁶⁰⁾.

PVX – Gelose Chocolate + PolyViteX™

O meio de chocolate PolyViteX™ é obtido a partir sangue de carneiro aquecido a 80°C fazendo com que ocorra a hemólise dos eritrócitos. Devido à hemólise, este meio fica enriquecido com os fatores X (hemina) e V (NAD), fornecidos pela hemoglobina. A este meio é ainda adicionado o PolyViteX™, um suplemento que vai fornecer vitaminas, coenzimas, aminoácidos, glucose e outros fatores que vão ajudar no crescimento de estirpes

fastidiosas como *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp., *Streptococcus pneumoniae*.

Classificação: Meio sólido não seletivo ⁽⁶⁰⁾.

HAE2 – Gelose Chocolate *Haemophilus* 2

É uma gelose de chocolate à qual se adicionou uma mistura de antimicrobianos, que permitem inibir a grande maioria das bactérias de Gram-positivo e das leveduras.

Classificação: Meio sólido seletivo para *Haemophilus* spp. ⁽⁶⁰⁾

VCA3 – Gelose Chocolate VCAT

Este meio é uma gelose de chocolate à qual se adicionou uma mistura de antimicrobianos – vancomicina, colistina, anfotericina B, trimetoprim – que permitem inibir a maior parte das bactérias e leveduras.

Classificação: Meio sólido seletivo para *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis* ⁽⁶⁰⁾.

HEK – Gelose Hektoen

A lactose, sacarose e salicina foram incluídas neste meio para se obter uma diferenciação ótima entre a cor das colónias e a do meio adjacente às colónias. As espécies de *Salmonella* e *Shigella* não fermentam estes compostos de carbono e, por conseguinte, não provocam uma alteração da cor do indicador de pH, ou seja, as colónias e o meio adjacente às mesmas vão apresentar-se verdes ou verde-azuladas. Por outro lado, os organismos que fermentam um ou vários compostos deste tipo em ácidos, por exemplo a *Escherichia coli*, fazem com que a cor mude para amarelo ou amarelo-salmão. O citrato de amónio férrico e tiosulfato de sódio presentes no meio permitem detetar a produção de sulfureto de hidrogénio (H₂S) pela *Salmonella* apresentando ou não centro negro; em relação às colónias de *Shigella* estas não apresentam centro negro. A presença de sais biliares vai inibir o crescimento das bactérias Gram-positivo e ainda retardar o crescimento de algumas *Enterobacteriales*. O sistema indicador do pH é composto pela fucsina ácida e azul de bromotimol.

Classificação: Meio sólido seletivo e diferencial para a *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. ⁽⁶⁰⁾

CAM – Gelose Campyloset

É um meio seletivo para isolar *Campylobacter* spp. a partir de fezes. Este meio tem presente sangue de carneiro para facilitar o crescimento e possui antimicrobianos para inibir a maior parte dos contaminantes bacterianos e fúngicos, assegurando-se assim a selectividade.

As colónias características de *Campylobacter* são pequenas e acinzentadas. A incubação deste meio deve ser feita em atmosfera de microaerofilia (5% de oxigénio).

Classificação: Meio sólido seletivo para *Campylobacter* spp. ⁽⁶⁰⁾

YER – Gelose *Yersinia*

Este meio destina-se à deteção e diferenciação das diferentes espécies de *Yersinia* spp. Devido à presença de vermelho neutro e manitol no meio é possível fazer-se a diferenciação através da cor das colónias, que vão de rosa-escuro a vermelhas. O colato, desoxicolato, cristal de violeta, Irgasan e os antimicrobianos presentes vão impedir o desenvolvimento das bactérias gram-positivo e da maior parte das Gram-negativo.

Classificação: Meio sólido seletivo ⁽⁶⁰⁾.

CLED – Gelose Cistina, Lactose, Deficiente em Eletrólitos

Este meio é usado para se diferenciar os MO que fermentam a lactose dos que não fermentam, através do indicador azul de bromotimol. As bactérias que fermentam a lactose dão origem a colónias amarelas devido à acidificação do meio ao passo que as não fermentadoras vão dar origem a colónias verdes, azuis ou incolores. A baixa concentração de eletrólitos impede o *swarming* do *Proteus* spp.

Classificação: Meio sólido não seletivo e diferencial ⁽⁶⁰⁾.

MCK – Gelose MacConkey

Neste meio, a presença de lactose pretende evidenciar as bactérias fermentadoras, através da viragem do indicador de pH, dando origem a colónias rosa ou vermelhas. As bactérias não fermentadoras dão origem a colónias incolores. Os ácidos biliares e o cristal violeta são responsáveis pela seletividade, pois impedem o crescimento das bactérias Gram-positivo.

Classificação: Meio sólido seletivo para Gram-negativo e diferencial ⁽⁶⁰⁾.

STRB – Gelose ChromID[®] Strepto B

É composto por uma base nutritiva que associa diferentes peptonas e 3 substratos cromogénicos. As colónias que são sugestivas de *Streptococcus agalactiae* vão apresentar-se rosa claro a vermelho, redondas e em forma de pérola. Grande parte das espécies bacterianas bem como as leveduras não se desenvolvem nem formam colónias características neste meio (inibição seletiva). A inoculação faz-se por espalhamento com zaragatoa.

Classificação: Meio sólido cromogénico e diferencial para *Streptococcus agalactiae* (Grupo B)
(60).

SGC2 – Gelose Sabouraud com Cloranfenicol 2

Este é o meio seletivo recomendado para o isolamento de fungos e leveduras. Devido à acidificação do meio e à presença de peptonas e dextrose favorece-se o desenvolvimento de fungos. A gentamicina e o cloranfenicol presentes inibem o crescimento bacteriano.

Classificação: Meio sólido seletivo para leveduras e fungos (60).

CAN2 – Gelose chromID® Candida

Este é um meio cromogénico para o isolamento seletivo de fungos leveduriformes bem como para a identificação de espécies de *Candida albicans*. Estas apresentam a cor azul devido à hidrólise do substrato cromogénico presente – hexosanibidase. Este meio também vai permitir a diferenciação, presuntiva, de um conjunto de espécies onde se agrupam a *Candida tropicalis*, *C. lusitanae* e *C. kefyr*. Estas hidrolisam um segundo substrato presente no meio e vão apresentar colónias com uma cor rosa. Estes 2 substratos cromogénicos vão permitir diferenciar as culturas mistas e orientar a identificação das outras espécies.

Classificação: Meio sólido cromogénico (60).

Müller Hinton – gelose Müller Hinton

Contém proteínas e hidratos de carbono que vão proporcionar o crescimento bacteriano. É o meio recomendado pela EUCAST para a realização dos TSA por difusão em disco (Kirby-Bauer) ou por difusão em gradiente de concentração – tira ϵ -test. A composição deste meio possibilita o crescimento de bactérias não fastidiosas (*Enterobacterales*, bacilos Gram-negativo não fermentadores, *Staphylococcus* e *Enterococcus*) garantindo a mínima interferência dos constituintes da fórmula com o resultado do TSA. A concentração de iões divalentes (cálcio e magnésio) no meio é ajustada para garantir uma determinação mais precisa da suscetibilidade das *Pseudomonas* aos aminoglicosídeos e tetraciclinas.

Classificação: Meio sólido não seletivo (60).

SCS – Gelose Schaedler + 5% sangue carneiro

Meio usado para o isolamento de anaeróbios estritos fastidiosos. Contém fatores de crescimento específicos para anaeróbios. O cloreto de sódio presente permite a manutenção do equilíbrio osmótico. Incubar a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ em condições de anaerobiose, durante pelo menos 48h.

Classificação: Meio sólido não seletivo ⁽⁶⁰⁾.

Caldo Schaedler

Usado para cultura de MO fastidiosos. É altamente nutritivo. Utilizado para a recuperação de anaeróbios.

Classificação: Meio líquido de enriquecimento não seletivo ⁽⁶⁰⁾.

MRSM – Gelose ChromID[®] MRSA SMART

É utilizada para o rastreamento de estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA). Contém uma mistura seletiva de antimicrobianos que inibe a maioria das bactérias de Gram-negativo e Gram-positivo (que não pertençam ao género *Staphylococcus*) e fungos. Na presença de MRSA observam-se colónias rosa a vermelho.

Classificação: Meio sólido cromogénico ⁽⁶⁰⁾.

Anexo I2

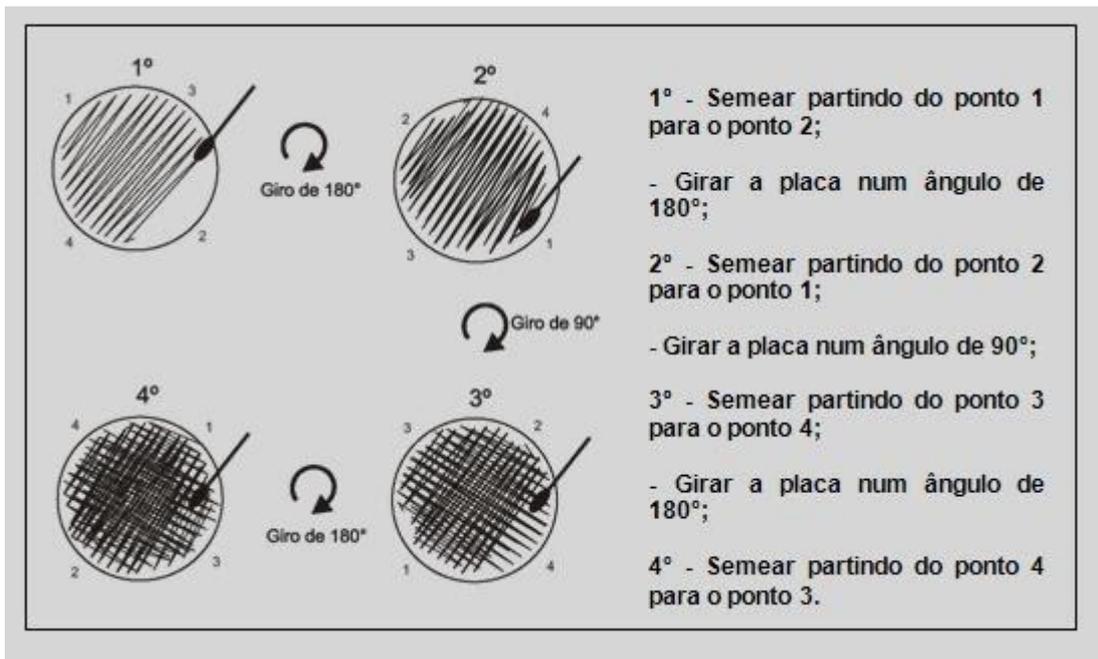


Figura 8 -Técnica de sementeira por espalhamento/ sementeira em toalha com zaragatoa ⁽⁷⁵⁾.

Fonte: <https://sites.google.com/site/254512/Home/microbiologia-1/Microbiologia-Veterinaria/bacteriologia-veterinaria/procedimento-para-a-realizacao-de-antibiograma>