

Ana Filipa Ribeiro

## Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Dra. Ana Donato, pela Dra. Helena Cunha Leal e pela Professora Doutora Maria do Céu Sousa e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Filipa Ribeiro

**Relatório de Estágio  
Mestrado em Análises Clínicas**

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas,  
orientado pela Dr<sup>a</sup> Ana Donato, pela Dr<sup>a</sup> Helena Cunha Leal e pela Professora  
Doutora Maria do Céu Sousa e apresentado à Faculdade de Farmácia da  
Universidade de Coimbra

Julho de 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



“A coisa mais indispensável a um Homem é reconhecer o uso que deve fazer do seu próprio conhecimento.”

- Platão, 427 a.C. - 347 a.C.



## **Agradecimentos**

Terminada mais esta jornada de dois anos, e já com a nostalgia característica que Coimbra faz sentir, resta-me agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que o meu esforço pudesse ser recompensado e sem as quais não teria chegado até aqui.

Assim, em primeiro lugar gostaria de agradecer à Professora Doutora Maria do Céu Sousa, coordenadora do Mestrado em Análises Clínicas e minha orientadora interna por toda a disponibilidade sempre demonstrada e ajuda na finalização deste trabalho.

À Dr<sup>a</sup> Ana Donato e à Dr<sup>a</sup> Helena Cunha Leal, Farmacêuticas especialistas em Análises Clínicas no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e no CoimbraLab, respetivamente, por terem aceite serem as minhas orientadoras externas e terem representado tão bem esse papel, prestando-me auxílio sempre que necessitei.

Às restantes equipas técnicas do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e do CoimbraLab por toda a paciência e por todo o tempo que despenderam para me transmitir um pouco dos seus conhecimentos e da sua alargada experiência.

À Olga e à Teresa, por, mesmo sem concordarem, compreenderem e apoiarem todas as minhas decisões ao longo dos últimos cinco anos. Foram, sem dúvida um apoio fundamental e nada teria sido igual sem elas. Obrigada pelo carinho, afeto e amizade.

Ao Fábio por toda a motivação e paciência. Por ter partilhado comigo todas as alegrias deste percurso e nunca me ter deixado desanimar quando as pedras se atravessaram no caminho. Obrigada por todo o amor.

Por último e sem dúvida o mais importante, à minha família, por me ampararem sempre as quedas e nunca me deixarem desistir. Por me incentivarem a travar cada batalha sem medo. Por me terem ensinado que nada se conquista sem esforço, mas que a recompensa vale sempre a pena. Obrigada por tudo!



# Índice

Abreviaturas e Siglas .....	ix
Índice de Figuras.....	xi
Índice de Tabelas.....	xii
<b>Resumo</b> .....	xiii
<b>Abstract</b> .....	xv
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Caracterização dos laboratórios de estágio</b> .....	2
2.1. Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia.....	2
2.2. CoimbraLab, Laboratório de Análises Clínicas.....	2
<b>3. Atividades desenvolvidas</b> .....	4
<b>4. Fase pré-analítica</b> .....	5
<b>5. Hematologia</b> .....	8
5.1. Hemograma.....	10
5.1.1. Anemias .....	10
5.1.1.1 Anemia hipocrômica e microcítica.....	11
5.1.1.2 Anemia macrocítica .....	12
5.1.1.3 Anemia normocítica .....	13
5.2. Esfregaço de sangue periférico (ESP) .....	13
5.3. Contagem de Reticulócitos.....	18
5.4. Provas de avaliação da hemostase .....	19
5.4.1. Tempo de protrombina (TP) e International Normalized Ratio (INR) .....	20
5.4.2. aPTT: Tempo de tromboplastina parcial ativada.....	21
5.5. Velocidade de sedimentação.....	21
5.6. Casos clínicos .....	22
<b>6. Microbiologia</b> .....	25
6.1. Coloração de Gram .....	25
6.2. Culturas.....	26
6.3. Meios de cultura.....	26
6.4. Produtos biológicos.....	28
6.4.1. Urina .....	29
6.4.2. Fezes .....	32
6.4.3. Exsudados nasais e faríngeos .....	34
6.4.4. Expetoração.....	35
6.4.5. Exsudado vaginal ou uretral.....	36
6.4.6. Exsudado purulento.....	37

6.4.7. Sangue .....	38
6.5. Identificação dos microrganismos .....	39
6.5.1. Métodos automatizados.....	39
6.5.2. Testes manuais.....	40
6.6. Suscetibilidade a antimicrobianos.....	42
6.7. Serologia Infeciosa.....	43
6.7.1. Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) .....	43
6.7.2. Wright.....	43
6.7.3. Reação de Rosa Bengala.....	43
6.7.4. Reação de Widal.....	44
6.7.5. Reação de Weil-Félix.....	44
6.7.6. Reação de Paul Bunnell.....	44
6.7.7. Marcadores virais.....	44
<b>7. Avaliação externa de qualidade.....</b>	<b>45</b>
<b>8. Fase pós-analítica.....</b>	<b>46</b>
<b>9. Conclusões.....</b>	<b>47</b>
<b>10. Bibliografia.....</b>	<b>49</b>
Anexo I. Equipamentos utilizados no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.....	xvii
Anexo II. Equipamentos utilizados no CoimbraLab.....	xix
Anexo III. Valores de referência do hemograma utilizados no LAC-FFUC .....	xxi
Anexo IV. Lista de antibióticos utilizados para validação dos antibiogramas no CoimbraLab .....	xxiii

## Abreviaturas e Siglas

aPTT	Tempo de tromboplastina parcial ativada, do inglês “ <i>activated partial thromboplastin time</i> ”
CAN	Gelose Chrom ID Candida
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
COS	Columbia agar + 5% sangue de carneiro
DGS	Direção Geral da Saúde
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês “ <i>deoxyribonucleic acid</i> ”
EBV	Vírus Epstein Barr, do inglês “ <i>Epstein–Barr virus</i> ”
ESP	Esfregaço de sangue periférico
FI	Fator intrínseco
FFUC	Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
FTA – ABS	Prova de absorção dos anticorpos treponémicos fluorescentes, do inglês “ <i>fluorescent treponemal antibody absorption test</i> ”
GV	Glóbulo vermelho
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina corpuscular média
Ht	Hematócrito
INR	Razão internacional normalizada, do inglês “ <i>international normalized ratio</i> ”
KESK	Espécies dos géneros <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> e <i>Citrobacter</i>
LAC – FFUC	Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
LCC	Laboratório Cruz de Celas – CoimbraLab
MAC	Mestrado em Análises Clínicas
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
PDW	Dispersão de volume plaquetar, do inglês “ <i>Plaquets Distribution Width</i> ”
PVX	Gelose chocolate PolyViteX
SPS	Polianetolsulfato de sódio, do inglês “ <i>sodium polyanethol sulfonate</i> ”
TDAR	Teste de Diagnóstico de Antígeno Rápido
TP	Tempo de protrombina
RDW	Dispersão de volume eritrocitário, do inglês “ <i>Red-cells Distribution Width</i> ”
VCS	Volume, Condutividade e Dispersão (“ <i>Scattering</i> ”)
VCM	Volume corpuscular médio

VDRL	Laboratório de pesquisa de doenças venéreas, do inglês “ <i>Venereal Disease Research Laboratory</i> ”
VPM	Volume plaquetar médio
WBC	Glóbulos brancos, do inglês “ <i>white blood cells</i> ”

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Recipientes para colheita de fezes (A) e de urina (B). .....	6
<b>Figura 2.</b> Histograma dos Glóbulos vermelhos obtido no Coulter HMX Hematology Analyzer.....	8
<b>Figura 3.</b> Alterações morfológicas dos eritrócitos onde estão representados Acantócitos (A), Esferócitos (B), Drepanócitos (C), Dacriócitos (D), Células em alvo (E) e Estomatócitos (F) .....	14
<b>Figura 4.</b> Observação ao microscópio ótico de neutrófilos em esfregaço de sangue periférico após coloração May Grunwald Giemsa. ....	16
<b>Figura 5.</b> Observação ao microscópio ótico de eosinófilos em esfregaço de sangue periférico após coloração May Grunwald Giemsa .....	16
<b>Figura 6.</b> Observação ao microscópio ótico de um basófilo em esfregaço de sangue periférico após coloração May Grunwald Giemsa .....	16
<b>Figura 7.</b> Observação ao microscópio ótico de monócito em esfregaço de sangue periférico após coloração May Grunwald Giemsa .....	17
<b>Figura 8.</b> Observação ao microscópio ótico de um linfócito em esfregaço de sangue periférico após coloração May Grunwald Giemsa .....	17
<b>Figura 9.</b> Observação ao microscópio de linfócitos ativados em esfregaço de sangue periférico, coloração May Grunwald Giemsa .....	17
<b>Figura 10.</b> Observação ao microscópio de reticulócitos corados com brilhante de cresil.....	19
<b>Figura 11.</b> Cascata de coagulação .....	20
<b>Figura 12.</b> Observação ao microscópio ótico de um esfregaço de sangue periférico realizado após Coloração May Grünwald Giemsa.....	22
<b>Figura 13.</b> Observação ao microscópio ótico de um esfregaço de sangue periférico de um homem de 21 anos após Coloração May Grünwald Giemsa.....	24
<b>Figura 14.</b> Composição da parede de bactérias Gram positivo (A) e Gram negativo (B).....	28
<b>Figura 15.</b> Observação macroscópica de colónias presuntivas de <i>E.coli</i> (A), <i>Enterococcus spp</i> (B), <i>Klebsiella spp</i> (C) e <i>Proteus spp</i> (D) em ChromID CPS – elite.....	30
<b>Figura 16.</b> Observação microscópica de leveduras num sedimento urinário .....	31
<b>Figura 17.</b> Observação de colónias azuis características de <i>Candida albicans</i> em Gelose ChromID Candida.....	31
<b>Figura 18.</b> Observação macroscópica de colónias de <i>Salmonella spp.</i> em Hecktoen.....	33
<b>Figura 19.</b> Observação ao microscópio ótico de um parasitológico de fezes. <i>Ascaris lumbricoides</i> (A), ovo de <i>Hymenolepis nana</i> (B) e ovo de <i>Trichuris trichiura</i> (C).....	34
<b>Figura 20.</b> Observação ao microscópio ótico do exsudado vaginal corado pelo Gram: observação de células epiteliais e bacilos Gram positivo. ....	36
<b>Figura 21.</b> Caldo chromID Granada positivo para a pesquisa de <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	37
<b>Figura 22.</b> Observação microscópica de alguns parasitas sanguíneos. Trofozoíto de <i>Plasmodium malariae</i> (A), trofozoíto de <i>Plasmodium vivax</i> (B), esquizonte de <i>Plasmodium ovale</i> (C), gametócito de <i>Plasmodium falciparum</i> (D), forma tripomastigota de <i>Trypanosoma brucei</i> (E), forma amastigota de <i>Leishmania spp</i> (F), <i>Loa loa</i> (G), trofozoítos de <i>Plasmodium falciparum</i> (H).....	39
<b>Figura 23.</b> Identificação de <i>Staphylococcus aureus</i> através do teste de aglutinação Slidex Staph Plus.....	41

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Tubos para colheita de sangue, respetiva constituição e utilização na prática laboratorial..	6
<b>Tabela 2.</b> Métodos utilizados pelo Coulter HMX Hematology Analyzer para a determinação dos diferentes parâmetros e respetivas definições.....	9
<b>Tabela 3.</b> Caracterização dos tipos de anemia.....	11
<b>Tabela 4.</b> Valores de referência da Velocidade de sedimentação (método de Westergren) .....	22
<b>Tabela 5.</b> Resultados do hemograma de um homem de 21 anos obtidos após análise no equipamentos HMX Hematology Analyzer. ....	23
<b>Tabela 6.</b> Microrganismos mais comuns na flora comensal e potenciais patogénicos no Homem ....	31
<b>Tabela 7.</b> Classificação da expectoração segundo o critério de Murray e Washington .....	35
<b>Tabela 8.</b> Cartas de Sensibilidade aos Antimicrobianos utilizados no VITEK II Compact pelo CoimbraLab. ....	42

## **Resumo**

O presente relatório tem como objetivo relatar as atividades desenvolvidas durante o estágio realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas (MAC) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. O estágio decorreu nos meses de Janeiro e Fevereiro no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (LAC-FFUC) e durante os meses de março, abril e maio no CoimbraLab, em Coimbra.

O relatório aborda em particular as áreas de Hematologia e Microbiologia, no entanto serão referidas as atividades desenvolvidas nas áreas de Imunologia, Endocrinologia e Bioquímica, realçando a importância dos diferentes exames realizados, os equipamentos e respetivas metodologias utilizadas, interpretação e validação dos resultados e referindo a importância do controlo de Qualidade.

**Palavras-Chave:** Hematologia, Microbiologia, Clínica, Diagnóstico, Saúde.



## **Abstract**

This report aims to describe the activities developed during the internship held in the field of a Master of Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra. The internship was in the months of January and February on the Laboratory of Analyses of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra, and in the months of March, April and May on Coimbra Lab in Coimbra.

The report covers the areas of Haematology and Microbiology however, the activities developed in the areas of Immunology, Endocrinology and Biochemistry will also be mentioned, highlighting the importance of the different tests performed, the equipment and respective methodologies, evaluation and validation of the results with special attention paid to the importance of performing quality control.

**Key words:** Hematology, Microbiology, Clinic, Diagnosis, Health.



## **I. Introdução**

No âmbito do Mestrado em Análises Clínicas (MAC) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra realizei o estágio curricular profissionalizante que visou o desenvolvimento de competências na área das análises clínicas. O estágio teve lugar no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra sob orientação da Dr<sup>a</sup> Ana Donato e no CoimbraLab sob orientação da Dr<sup>a</sup> Helena Cunha Leal.

O estágio foi crucial para eu adquirir novos conhecimentos, aprofundar conceitos já adquiridos e integrar-me na rotina laboratorial nas áreas de Hematologia, Imunologia e Endocrinologia, Bioquímica e Microbiologia. O presente relatório aborda em particular as áreas de Hematologia e Microbiologia realçando as análises realizadas e as atividades desenvolvidas.

Após tomar conhecimento da parte organizacional dos laboratórios, pude acompanhar as diferentes fases do processamento das amostras: pré-analítica, analítica e pós-analítica.

Algumas análises são pedidas com menos frequência e, por isso, não se justifica que os laboratórios tenham os equipamentos necessários para as realizar. Desta forma, ambos os laboratórios em que realizei o estágio possuem acordos com laboratórios subcontratados que executam essas análises com benefícios tanto de custo como de confiabilidade de resultados.

As análises clínicas assumem elevada importância no diagnóstico clínico bem como na monitorização da terapêutica, pelo que é fundamental exigência e rigor na prática laboratorial por parte de todos os profissionais envolvidos.

## **2. Caracterização dos laboratórios de estágio**

### **2.1. Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia**

O laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (LAC-FFUC) foi criado em Outubro de 1983 e funciona nas instalações da faculdade. Dispõe de um posto de colheitas nos Serviços de Saúde da Universidade, situado no edifício antigo da Faculdade de Medicina, no Polo I. O laboratório presta serviço à comunidade universitária bem como à comunidade em geral tendo em média 15 utentes por dia.

O LAC-FFUC tem também uma fortíssima componente pedagógica funcionando como local de ensino na área das análises clínicas. Os estudantes do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) e os estudantes do MAC têm algumas aulas práticas laboratoriais das unidades curriculares de Hematologia, Imunologia Complementar e Bioquímica Clínica I.

O laboratório tem como diretora técnica a Dr<sup>a</sup> Ana Donato, Farmacêutica especialista em análises clínicas, uma Diretora técnica-adjunta, um técnico de análises clínicas e duas funcionárias administrativas.

O laboratório é constituído por várias áreas como sala de espera, secretaria, sala de colheitas, dois gabinetes, casas de banho, armazém e laboratório.

As amostras, consoante as requisições clínicas, são distribuídas nos diferentes setores do laboratório: Hematologia, Endocrinologia e Imunologia, Bioquímica e Microbiologia.

O processamento das análises é realizado com recurso a vários equipamentos automatizados (Anexo I). Os equipamentos são preparados diariamente, no que respeita a reagentes, calibradores e controlos, tendo em conta as recomendações do fabricante para cada aparelho.

### **2.2. CoimbraLab, Laboratório de Análises Clínicas**

O Laboratório Cruz de Celas – CoimbraLab (LCC) é um laboratório que se encontra certificado pelas Normas para Laboratório Clínico da Ordem dos Farmacêuticos e pela Norma ISO 9001:2015. A sede do laboratório situa-se no Vale das Flores em Coimbra. A Dr<sup>a</sup> Helena Cunha Leal é a diretora técnica, sendo Especialista em Análises Clínicas pela Ordem dos Farmacêuticos.

Para além destas instalações, o laboratório possui também vários postos de colheita de amostras que se localizam em Coimbra e nos arredores: Vila Nova de Poiares, Brasfemes,

Lousã, Penacova, Celas, São Martinho do Bispo, Santa Clara, Gois e Taveiro. Possui, também, acordos com vários lares e empresas de medicina no trabalho para a realização de análises clínicas aos seus utentes. Paralelamente, o LCC possui também um serviço de colheita de amostras ao domicílio de forma a facilitar a realização de análises clínicas a pessoas que não conseguem deslocar-se às instalações.

○ CoimbraLab tem em média cerca de 180 utentes por dia.

○ laboratório central é dividido em três grandes áreas: receção e atendimento, área administrativa e área laboratorial. A área laboratorial, onde realizei o estágio, é dividida em quatro setores: Bioquímica, Hematologia, Imunologia e Microbiologia.

As análises são realizadas com recurso a vários equipamentos automatizados (Anexo II). Os equipamentos são preparados diariamente, no que respeita a reagentes, calibradores e controlos, tendo em conta as recomendações do fabricante para cada aparelho.

### **3. Atividades desenvolvidas**

Como já foi referido, as áreas que vão ser mais desenvolvidas no presente relatório serão Hematologia e Microbiologia. No entanto, desenvolvi atividades noutras áreas, nomeadamente em Imunologia/Endocrinologia e Bioquímica.

Na área de Imunologia/endocrinologia foi possível realizar a deteção/doseamento de diversos parâmetros nomeadamente hormonas (Progesterona, Testosterona, Estradiol, Hormona Folículo-Estimulante, Hormona Lúteo-Estimulante, Prolactina, Insulina, Paratormona, etc.), marcadores tumorais (Ca 19-9, Ca 125, Ca 15-3, Alfa-Fetoproteína, Antígeno Carcinoembrionário, Antígeno específico da próstata nas frações total e livre, etc.) e marcadores virais (Antígeno de superfície do Vírus da Hepatite B, Antígeno do core do Vírus da Hepatite B, etc.).

Na área da Bioquímica realizei determinações de Glucose, Albumina, Bilirubina total, Bilirubina direta, Cálcio, Colesterol total, Colesterol HDL, Colesterol LDL, Triglicéridos, Creatinina, Lactato desidrogenase, Ferro, Magnésio, Fosfato, Proteínas totais, Ureia, Ácido úrico, Gama GT, Fosfatase alcalina, Ionograma, Hemoglobina glicada, Proteinograma, etc.

## 4. Fase pré-analítica

As Análises Clínicas são fundamentais como meios complementares de diagnóstico e na monitorização da terapêutica fornecendo uma grande variedade de informações sobre o estado de saúde do indivíduo. O objetivo do laboratório é dar informação analítica sobre as amostras biológicas, em tempo útil e com a melhor qualidade possível. O bom desempenho do ciclo laboratorial, compreendido pelas fases pré-analítica, analítica e pós analítica é crucial para que o objetivo do laboratório seja cumprido com rigor e rapidez.

A fase pré-analítica compreende os processos desde o pedido do clínico, incluindo a requisição analítica, a preparação do doente, a colheita da amostra, armazenamento e transporte para o laboratório, e, se for o caso, preparação para a análise através de centrifugação, descongelamento, etc.<sup>1</sup>

Os avanços tecnológicos e os processos de garantia de qualidade reduziram significativamente os erros analíticos pelo que a fase pré-analítica se tornou a maior fonte de erro que pode afetar os resultados. Assim, é de extrema importância a padronização de procedimentos nesta fase de modo a garantir a qualidade do resultado final.<sup>1</sup>

A requisição analítica deve conter a identificação do utente bem como do prescritor autorizado, dados clínicos pertinentes que devem incluir no mínimo género e data de nascimento, exames requisitados e por fim deve ser indicada a hora e data da colheita e da chegada das amostras ao laboratório.<sup>2</sup>

Há determinadas amostras que podem ser colhidas pelo utente, como por exemplo as fezes e a urina entre outros, pelo que é de grande importância a preparação do utente no que diz respeito à forma como a colheita deve ser realizada. Assim, aquando do fornecimento dos recipientes de colheita da amostra (Figura 1) deve ser indicado o procedimento para a colheita e se necessário recorrer a ilustrações. Em relação à urina, há vários métodos de colheita de urina mas para análise de rotina geralmente é feita a colheita da 1ª urina da manhã. Deve ser feita a lavagem das mãos e dos órgãos genitais com água e sabão da frente para trás recorrendo a uma gaze. Durante a micção deve ser desprezado o primeiro jato e colher o jato intermédio para recipiente esterilizado e de boca larga. A colheita de fezes deve ser feita para um recipiente limpo e seco e não deve ter mais do tamanho de uma noz. Devem ser colhidas três amostras em dias consecutivos, tendo o cuidado de não serem misturadas com urina ou papel higiénico.<sup>3</sup>



**Figura I.** Recipientes para colheita de fezes (A) e de urina (B) (foto LAC-FFUC).

Durante a colheita de amostra, os profissionais de saúde devem usar luvas adequadas e realizar a higiene das mãos antes e depois de cada procedimento com o utente. A colheita deve ser realizada num local dedicado a esse fim e como prevenção de risco de contaminação com agentes patogénicos, as superfícies de trabalho devem ser limpas com desinfetante com regularidade.<sup>4</sup> No que diz respeito à colheita de sangue é importante ter em conta que consoante os exames requisitados, diferentes são os tubos para os quais a amostra é colhida (Tabela I): sangue total se é pedido por exemplo o hemograma; plasma se são pedidas provas de avaliação da hemóstase; soro para testes bioquímicos. Quando a análise é realizada em soro, a colheita é feita em tubo sem anticoagulante, quando se pretende fazer a análise no plasma, a amostra deve ser colhida em tubo com anticoagulante específico.<sup>5</sup>

**Tabela I.** Tubos para colheita de sangue, respetiva constituição e utilização na prática laboratorial.<sup>5</sup>

<b><u>Tubos de colheita</u></b>	<b><u>Anticoagulante</u></b>	<b><u>Utilização</u></b>
	EDTA K <sub>3</sub> (1,5 +/- 0,25 mg por ml sangue)	Hemograma e HbA <sub>1c</sub>
	Sem anticoagulante	Bioquímica (creatinina, glicose, ureia, colesterol, etc.) Imunologia (pesquisa de antígenos ou anticorpos, etc.)
	Citrato de sódio 32 g/L (na proporção de 9 partes de sangue para 1 de anticoagulante)	Provas de avaliação da hemóstase
	Citrato trissódico (na proporção de 4 partes de sangue para 1 de anticoagulante)	Velocidade de sedimentação eritrocitária

A fase pré-analítica concentra a maior parte dos erros que podem gerar resultados não consistentes com o quadro clínico do utente. Estima-se que problemas nesta etapa sejam responsáveis por cerca de 60% do erro total. Entre eles destacam-se os aspetos relacionados com a preparação do paciente, a necessidade ou não do jejum, identificação incorreta do utente, utilização de um recipiente inadequado para a colheita, preparação incorreta da amostra ou mesmo colheita de um volume inadequado de amostra.<sup>6,7,8</sup>

De forma a minimizar a ocorrência de erros, todas as fases, sobretudo a pré-analítica, devem ser conduzidas seguindo o rigor técnico necessário para garantir a segurança do utente e a obtenção de resultados exatos. Nesse sentido, no início do trabalho procede-se à avaliação dos resultados do Controlo de Qualidade Interno e caso haja algum problema de carácter técnico são contactados os fornecedores para a sua resolução.

A implementação e execução do Controlo Interno de Qualidade é de extrema importância de forma a assegurar um funcionamento eficiente dos procedimentos laboratoriais garantindo a repetibilidade e uniformidade dos resultados que são obtidos. Para tal são analisadas amostras com valor conhecido e os resultados são analisados em cartas de controlo.

## 5. Hematologia

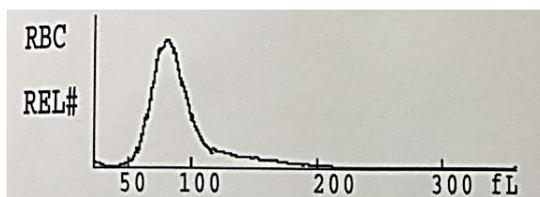
A hematologia é um exame laboratorial que faz a análise quantitativa (contagem) e qualitativa (morfológico) das células sanguíneas e dos índices hematológicos como VCM, HCM, CHCM e RDW.<sup>9</sup>

No LAC-FFUC, durante o meu estágio, foram dois os aparelhos utilizados no setor de Hematologia, o Coulter HMX Hematology Analyzer e o Beckman Coulter DXH500. Há algumas diferenças entre estes dois aparelhos, nomeadamente o volume de amostra utilizado, o Beckman Coulter DXH500 utiliza 12 µl de amostra enquanto que o HMX utiliza 185 µl, a metodologia para o doseamento de hemoglobina em que o primeiro faz uma medição fotométrica de oxihemoglobina e o segundo mede fotometricamente a cianometahemoglobina. O DXH500 apresenta vantagens no que diz respeito à produção de resíduos menos tóxicos e à utilização de menos quantidade de amostra, mas só estava no LAC-FFUC em processo de validação.<sup>10</sup>

Os dois aparelhos baseiam-se no princípio de Coulter para a contagem de Glóbulos vermelhos (GV), Glóbulos brancos (GB) e Plaquetas (PLT) utilizando o método de impedância. Neste método as células passam, uma a uma, através de uma abertura com uma corrente elétrica, introduzindo uma alteração da impedância determinada pelo seu tamanho e é com base na amplitude do impulso elétrico que é gerado um histograma (Figura 2).<sup>11</sup>

Para fazer a contagem diferencial dos leucócitos, fórmula leucocitária, as células passam por três canais em que são avaliados dos parâmetros: **V**olume, **C**onduktividade e **D**ispersão (“**S**cattering”) (VCS).

Os GB, os GV e as PLT são medidos segundo o princípio de Coulter, a hemoglobina (Hb) é medida por espectrofotometria e os índices eritrocitários (o hematócrito, Ht; a hemoglobina corpuscular média, HCM e a concentração de hemoglobina corpuscular média, CHCM) são calculados (Tabela 2).



**Figura 2.** Histograma dos Glóbulos vermelhos (GV) obtido no Coulter HMX Hematology Analyzer (foto LAC-FFUC).

**Tabela 2.** Métodos utilizados pelo Coulter HMX Hematology Analyzer para a determinação dos diferentes parâmetros e respectivas definições.<sup>11</sup>

<b><u>Parâmetro</u></b>	<b><u>Definição</u></b>	<b><u>Determinação</u></b>
GV	Contagem de eritrócitos Diminuição na contagem - eritropenia Aumento na contagem - eritrocitose	Princípio de Coulter
Hb	Concentração de hemoglobina	Medição fotométrica da cianometahemoglobina
Ht	Hematócrito Volume de massa eritroide. Correlaciona-se com a viscosidade sanguínea.	Calculado (GV*VCM/10, em %)
VCM	Volume corpuscular médio Determina o volume médio de cada eritrócito	Derivado do histograma (FI)
HCM	Hemoglobina corpuscular média Conteúdo médio de hemoglobina por eritrócito.	Calculado (Hb/GV, em pg)
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média Traduz a percentagem de hemoglobina que está contida em cada eritrócito.	Calculado (Hb/Ht, em g/dl)
RDW	Dispersão de volume eritrocitário Expressão numérica da anisocitose	Derivado do histograma
WBC	Contagem de leucócitos Aumento da contagem - leucocitose Diminuição da contagem - leucopenia	Princípio de Coulter
NE, LY, MO, EO, BA (%)	Contagem de neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos em %	Tecnologia VCS
NE, LY, MO, EO, BA (#)	Contagem absoluta de neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos	Calculado (valor da população em %*GB/100)
PLT	Contagem de plaquetas Aumento na contagem - trombocitose Diminuição na contagem - trombocitopenia	Princípio de Coulter
VPM	Volume plaquetar médio Útil na avaliação do tamanho e morfologia das plaquetas	Derivado do histograma
PDW	Dispersão do volume plaquetar Traduz o índice de variação no tamanho das plaquetas	Derivado do histograma

## 5.1. Hemograma

O hemograma é uma análise que é composta pela contagem das diferentes células maduras sanguíneas e pela determinação de várias constantes como o hematócrito, a concentração de hemoglobina corpuscular média, entre outros.

A prescrição deve obrigatoriamente conter dados sobre diagnóstico/informação clínica, sexo do utente e data. São usadas amostras de sangue total colhido em tubo com EDTA e avaliados vários parâmetros nomeadamente glóbulos vermelhos, hemoglobina, glóbulos brancos, plaquetas, etc. (Tabela 2).<sup>12</sup>

O hemograma é a análise mais requisitadas no LAC-FFUC e os resultados são analisados de acordo com os valores de referência do laboratório (Anexo III).

O hemograma é muito importante para avaliação de diversas situações, como no diagnóstico e evolução de doenças hematológicas, deteção de quadros infecciosos e na monitorização terapêutica. A associação dos dados quantitativos, aspetos morfológicos e conhecimento fisiopatológico das alterações da hematopoiese são importantes para um diagnóstico preciso da patologia.<sup>12</sup>

No que diz respeito ao hemograma, diariamente são realizados dois níveis de controlo (alto, baixo ou normal alternadamente) antes de proceder às análises dos utentes de modo a garantir que os resultados obtidos são de confiança.

### 5.1.1. Anemias

A palavra anemia é originária do Grego e significa “sem sangue”. Nos tempos atuais a definição de anemia surge como “qualquer condição caracterizada pela diminuição da concentração de hemoglobina”.<sup>13</sup>

A hemoglobina é uma proteína de estrutura quaternária constituída por uma parte globínica que é dividida em 4 cadeias proteicas e uma parte não proteica (grupo prostético) constituída por 4 grupos heme que têm capacidade para transportar 4 iões de ferro na sua forma de ferro ferroso ( $Fe^{2+}$ ) que permitem a ligação da hemoglobina ao oxigénio.<sup>13</sup>

As principais hemoglobinas no adulto são a Hb A ( $\alpha_2\beta_2$ ), 96 % a 98 %, Hb A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ), 1,5 % a 2,3 % e Hb F ( $\alpha_2\gamma_2$ ), 0,5 % a 0,8 %. A sua principal função é a oxigenação dos tecidos pelo que a sua diminuição vai ter efeitos nefastos nos mesmos.<sup>13</sup>

Os sintomas que surgem em casos de anemia são inespecíficos e dependem do ritmo de descida da Hb. Se a anemia se instala rapidamente, como acontece em casos de hemorragia aguda o doente pode entrar em choque ainda que apresente um Ht normal. Se a hemoglobina descer para a mesma concentração de uma forma insidiosa, a anemia é tolerada

de uma forma melhor porque há um aumento compensatório dos ritmos cardíaco e respiratório e uma diminuição da afinidade da Hb para o oxigénio (O<sub>2</sub>).<sup>13</sup>

Em termos fisiopatológicos as anemias podem ser devidas a alteração da produção dos GV, destruição aumentada dos GV ou aumento da perda de GV.<sup>14</sup>

Com base nas constantes eritrocitárias (HCM e VCM) a anemia pode ser classificada em hipocrómica, normocrómica e hiperocrómica, microcítica, normocítica e macrocítica (Tabela 3).

**Tabela 3.** Caracterização dos tipos de anemia.<sup>15</sup>

<b>Anemia</b>	<b>Constantes</b>	<b>Causas</b>
<b>Microcítica</b> <b>Hipocrómica</b>	VCM < 80 fl HCM < 27 pg	Anemias sideropénicas Anemias sideroblásticas Talassemias
<b>Normocítica</b> <b>Normocrómica</b>	80 < VGM < 96 fL 27 < HCM < 33 pg	Anemias das doenças crónicas Anemias hemolíticas
<b>Macrocítica</b>	VCM > 96 Fl	Deficiências em vitamina B12 e ácido fólico Anemia perniciosa Medicamentos Álcool
<b>Hiperocrómica</b>	HCM > 33 pg	Esferecitose hereditária

### 5.1.1.1 Anemia hipocrómica e microcítica

A hemoglobina é formada por dois pares de cadeias globínicas e um grupo heme constituído por um ião de ferro num anel de protoporfirina. Quando há falta de ferro para a formação do grupo heme ou há poucas cadeias globínicas disponíveis, a síntese da hemoglobina é afetada, os glóbulos vermelhos são mais pequenos (microcitose) e menos corados (hipocromia). Entre as causas de hipocromia estão a sideropenia, talassemia, alterações congénitas do metabolismo do heme, etc.<sup>13</sup>

#### **Anemia sideropénica:**

A anemia sideropénica é a forma de anemia mais comum. Nestes casos é iniciado um tratamento com ferro oral em dose adequada, caso não se verifiquem melhorias é porque há perdas abundantes ou má absorção. Quando não há resposta a este tratamento a avaliação de outro parâmetro mostra-se vantajosa. Se a ferritina for normal ou elevada deve-se suspeitar de uma talassemia ou de uma anemia das doenças inflamatórias, se ferritina está reduzida a suspeita incide na possível má absorção do ferro.<sup>13</sup>

## **Talassémias**

As talassémias denominam-se  $\alpha$  ou  $\beta$  e surgem quando há redução ou ausência de síntese de uma das cadeias globínicas que constituem a Hb.<sup>13</sup>

$\beta$ -Talassemias: A síntese de cadeias globínicas  $\beta$  depende da expressão de um gene localizado no cromossoma 11. Este gene pode sofrer mutações que impossibilitem a síntese de cadeias ou que reduzam a quantidade de cadeias sintetizadas. Na  $\beta$ -talassémia menor só um dos alelos do gene está mutado (heterozigotia), Hb A<sub>2</sub> aumenta (> 3,5 %) e a Hb F mantém-se normal ou aumenta ligeiramente. Na  $\beta$ -talassémia intermédia os dois alelos do gene estão mutados (homozigotia) mas ainda sintetizam algumas cadeias globínicas  $\beta$ , a Hb A<sub>2</sub> e Hb F estão elevadas, o VCM e a HCM estão baixos, o RDW e taxa de reticulócitos elevados. Se não houver síntese destas cadeias, não há Hb A (ou há uma quantidade muito escassa), a Hb F está elevada e a anemia é grave, dependente de transfusões desde o primeiro ano de vida.<sup>13</sup>

$\alpha$ -Talassemias: Para a síntese das cadeias globínicas  $\alpha$  há dois genes homólogos,  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , no cromossoma 16. As  $\alpha$ -talassemias resultam, mais frequentemente, da deleção de um ou dos dois genes num dos alelos.<sup>13</sup>

## **Alterações no metabolismo do heme**

As alterações no metabolismo do heme levam ao aparecimento de doenças caracterizadas por anemia hipocrómica e microcítica com RDW elevado, dimorfismo acentuado a nível dos GV, ferritina e saturação de transferrina elevadas. As principais complicações estão associadas a sobrecarga de ferro, o que obriga a monitorização regular e tratamento quelante.<sup>13</sup>

### **5.1.1.2. Anemia macrocítica**

As anemias macrocíticas podem ser megaloblásticas (deficiências de vitamina B<sub>12</sub> ou de ácido fólico) ou não megaloblásticas.<sup>13</sup>

### **Anemia megaloblástica**

Os défices de vitamina B<sub>12</sub> e de ácido fólico afetam a síntese do ADN, com repercussão nos precursores eritróides, mielóides e megacariocíticos, de que resulta anemia. No sangue periférico observam-se macrócitos, pontuado basófilo e neutrófilos hipersegmentados.<sup>13</sup>

As causas mais frequentes são a deficiência nutricional de folatos e a má absorção da vitamina B<sub>12</sub> por déficit de fator intrínseco (FI). Em casos de ausência completa de FI a anemia denomina-se Anemia perniciososa.<sup>13</sup>

### **Anemia não- megaloblástica**

Uma macrocitose, com ou sem anemia, pode ocorrer no decurso de doença hepática, em casos de alcoolismo, displasia da medula óssea, etc.

Ao contrário das anemias megaloblásticas, nestas patologias não são evidentes alterações megaloblásticas na medula, nem neutrófilos hipersegmentados no sangue periférico.

#### **5.1.1.3. Anemia normocítica**

Algumas das causas de anemia normocítica são hemorragia aguda, doença inflamatória crónica, doença renal, etc. Uma anemia pode ser normocítica no estágio inicial, e evoluir para micro ou, menos frequentemente, para macrocítica. Quando há associação de vários fatores etiológicos, por exemplo nas patologias do tubo digestivo com má absorção de ácido fólico e/ ou da vitamina B<sub>12</sub> e carência de ferro a anemia pode ser normocítica com RDW elevado.<sup>13</sup>

## **5.2. Esfregaço de sangue periférico (ESP)**

Com o desenvolvimento de instrumentos automatizados sofisticados para contar e caracterizar as células sanguíneas, os esfregaços de sangue periférico (ESP) corados são realizados em menor número. No entanto, a realização de um esfregaço sanguíneo é importante para esclarecer alguns resultados do hemograma obtidos instrumentalmente. A Direção Geral de Saúde (DGS) recomenda a observação morfológica das células sanguíneas em várias situações, nomeadamente diminuição da concentração de hemoglobina (anemia), aumento ou diminuição do volume globular médio eritrocitário (macrocitose e microcitose, respetivamente), alterações na fórmula leucocitária, aumento ou diminuição na contagem de plaquetas (trombocitose e trombocitopenia, respetivamente).<sup>16</sup>

No LAC-FFUC os esfregaços são realizados manualmente. Depois de seco o esfregaço é fixado com metanol e corado por May-Grünwald-Giemsa.

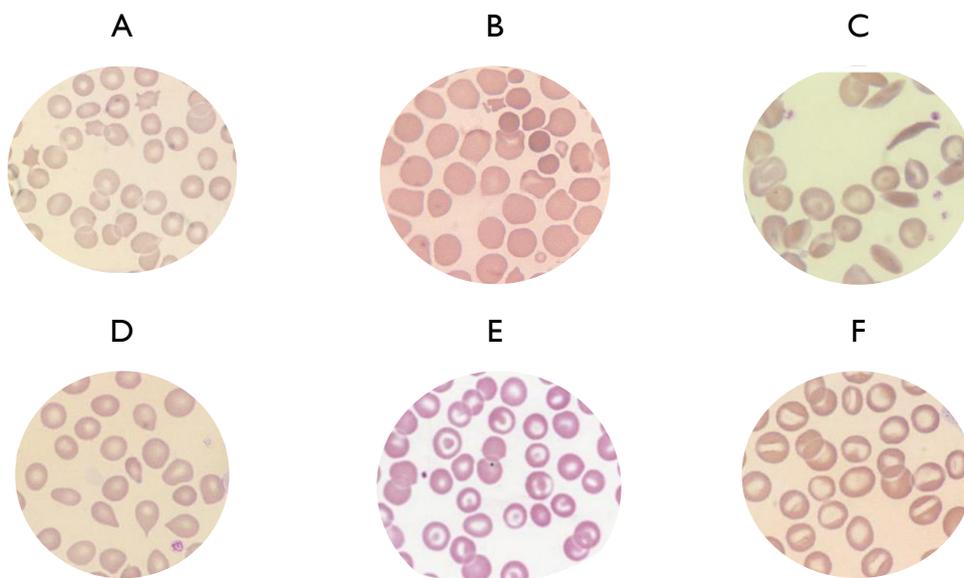
O azul de metileno, corante básico, cora apenas estruturas basófilas (ácidos nucleicos, basófilos neutrófilos), a eosina, corante ácido, cora estruturas acidófilas (hemoglobina e granações dos eosinófilos).<sup>15</sup>

No ESP podem ser observados Glóbulos Vermelhos, Glóbulos Brancos e Plaquetas.

### Glóbulos Vermelhos

Os glóbulos vermelhos são células anucleadas, possuem um citoplasma acidófilo devido à presença de hemoglobina. A membrana é constituída por actina, anquirina, proteínas de banda 3, banda 4.1, banda 4.2 e espectrina o que lhes confere a forma bicôncava. Em situações patológicas podem ocorrer variações no tamanho (anisocitose), forma (poiquilocitose), coloração, presença de inclusões, etc. (Figura 3).<sup>17</sup>

Os eritrócitos apresentam várias formas que estão associadas a patologias específicas ou a situações de infecção ou inflamação. Durante o estágio aquelas com que mais tive contato foram acantócitos, esferócitos, drepanócitos, dacriócitos, células em alvo e estomatócitos (Figura 3).



**Figura 3.** Alterações morfológicas dos eritrócitos onde estão representados Acantócitos (A), Esferócitos (B), Drepanócitos (C), Dacriócitos (D), Células em alvo (E) e Estomatócitos (F).<sup>18</sup>

Os acantócitos são eritrócitos com espículas e que geralmente estão associados a patologias hepáticas em que há alteração no metabolismo do colesterol, importante na manutenção da estabilidade da membrana celular.<sup>18</sup>

Os esferócitos resultam de alterações genéticas nas proteínas de banda 3, banda 4.1, anquirina ou espectrina, ou da sensibilização dos eritrócitos por anticorpos específicos para as proteínas de superfície. Perdem a maleabilidade e diminuem o seu tamanho devido à forma esférica que adquirem.<sup>18</sup>

Os drepanócitos, células em foice, resultam de uma alteração qualitativa da hemoglobina, pela substituição de um aminoácido nas cadeias  $\beta$  da hemoglobina, levando à formação de hemoglobina S. Os eritrócitos são mais rígidos e, por isso, não conseguem exercer a sua função. São característicos da drepanocitose ou anemia falciforme.<sup>18</sup>

Os dacriócitos são células em forma de lágrima que aparecem devido a deformações na membrana do glóbulo vermelho e que estão associadas a situações de anemia.<sup>18</sup>

As células em charuto são células muito características de formato comprido e achatado, que aparecem frequentemente nas anemias sideropénicas e permitem ajudar no diagnóstico das mesmas.<sup>18</sup>

As células em alvo são células que possuem uma zona descorada em redor de um ponto corado e concentrado a nível central, que resultam principalmente de problemas hepáticos.<sup>18</sup>

Os estomatócitos são células que apresentam uma depressão descorada e central e o seu aparecimento pode resultar de alterações da permeabilidade membranar aos iões. Estas células estão frequentemente associadas ao consumo crónico de álcool ou de problemas renais.<sup>18</sup>

### **As plaquetas**

As plaquetas resultam da fragmentação do megacariócito, são de tamanho muito reduzido, forma irregular e possuem grânulos. Na corrente sanguínea assumem uma relevante importância na hemóstase. Relativamente à população plaquetar no ESP, podemos encontrar diferentes tipos de população, sendo que a anisocitose plaquetar é bastante comum, seguida pela presença de plaquetas gigantes.<sup>19</sup>

### **Os leucócitos**

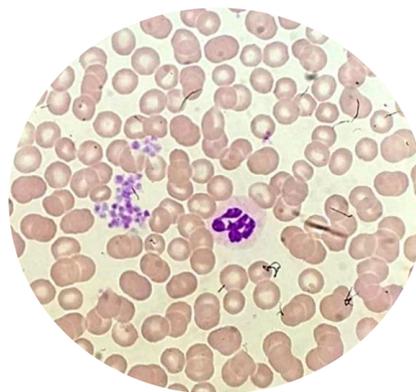
Os leucócitos são responsáveis pela defesa do nosso organismo contra microrganismos estranhos ou moléculas tóxicas. Classificam-se em cinco tipos: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos. Enquanto determinadas células são responsáveis por processos de fagocitose (neutrófilos e monócitos), outras estão mais envolvidas na libertação de moléculas citotóxicas e no reconhecimento de antígenos ou na produção de anticorpos (linfócitos).<sup>17</sup>

Os Neutrófilos atuam na defesa do organismo contra processos infecciosos, através de algumas propriedades que lhes são próprias como motilidade, quimiotaxia, fagocitose e ação bactericida.<sup>20</sup> São células com citoplasma acidófilo, com núcleo lobulado com cromatina densa (3 a 5 lóbulos) (Figura 4).<sup>15</sup>

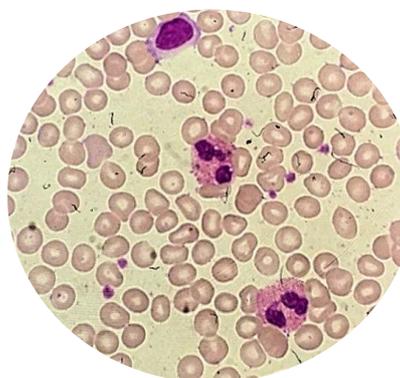
Os Eosinófilos aumentam em resposta a estímulos imunológicos como processos alérgicos e infecções parasitárias. São células com citoplasma acidófilo, núcleo habitualmente bilobado e com cromatina densa. É frequente a presença da grânulos acidófilos por todo o citoplasma (Figura 5).<sup>15,14</sup>

Os Basófilos são responsáveis pela regulação da resposta a processos inflamatórios locais.<sup>21</sup> Têm geralmente tamanho semelhante a um neutrófilo.<sup>20</sup>

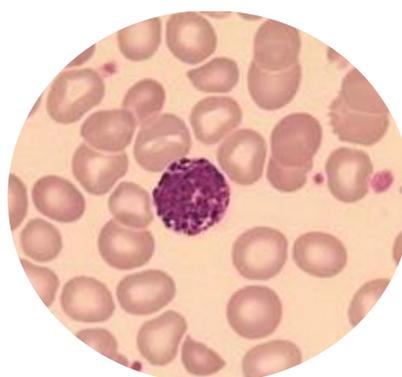
São células com citoplasma acidófilo, com núcleo lobulado (2 a 3 lóbulos) e cromatina densa. Estão também presentes vários grânulos grosseiros distribuídos por todo o citoplasma sendo que por vezes sobrepõem-se ao núcleo (Figura 6).<sup>15</sup>



**Figura 4.** Observação ao microscópio ótico de neutrófilos em esfregaço de sangue periférico após coloração May Grunwald Giemsa (ampliação 1000x) (foto LAC-FFUC).



**Figura 5.** Observação ao microscópio ótico de eosinófilos em esfregaço de sangue periférico após coloração May Grunwald Giemsa (ampliação 1000x) (foto LAC-FFUC).



**Figura 6.** Observação ao microscópio ótico de um basófilo em esfregaço de sangue periférico após coloração May Grunwald Giemsa (ampliação 1000x).

Os Monócitos são os precursores dos macrófagos. Integram a imunidade tanto humoral quanto a celular.<sup>20</sup>

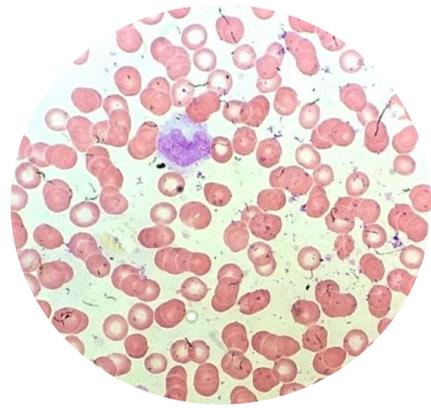
São responsáveis pela fagocitose de bactérias, parasitas e fungos.<sup>21</sup>

São células com citoplasma basófilo de tamanho e forma variáveis, com núcleo habitualmente em forma de U e com malha cromatínica aberta, podendo existir vacúolos na célula (Figura 7).<sup>15</sup>

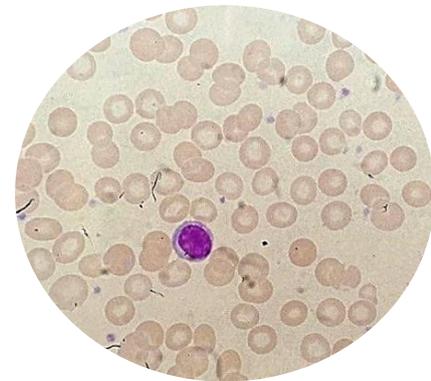
Os Linfócitos são células normalmente pequenas, com citoplasma basófilo, núcleo sem lóbulos e com cromatina densa. Têm elevada relação núcleo/citoplasma e não possuem grânulos específicos (Figura 8).<sup>15</sup>

Linfócitos B maturam e originam plasmócitos – células produtoras de anticorpos. Linfócitos T atuam na defesa contra vírus, antígenos estranhos e tumores.<sup>21</sup> Os linfócitos B e T são morfologicamente iguais.

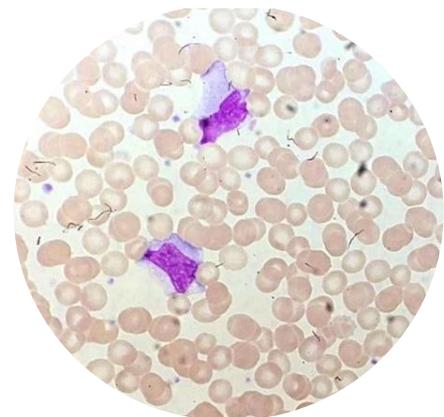
Os Linfócitos ativados têm uma relação núcleo/citoplasma menor do que os linfócitos normais, malha cromatínica aberta e com uma organização mais irregular. O citoplasma é basofílico e surge com frequência a envolver os eritrócitos (Figura 9).<sup>21</sup>



**Figura 7.** Observação ao microscópio ótico de monócito em esfregaço de sangue periférico após coloração May Grunwald Giemsa (ampliação 1000x) (foto LAC-FFUC).



**Figura 8.** Observação ao microscópio ótico de um linfócito em esfregaço de sangue periférico após coloração May Grunwald Giemsa (ampliação 1000x) (foto LAC-FFUC).



**Figura 9.** Observação ao microscópio de linfócitos ativados em esfregaço de sangue periférico, coloração May Grunwald Giemsa (ampliação 1000x) (foto LAC-FFUC).

### 5.3. Contagem de Reticulócitos

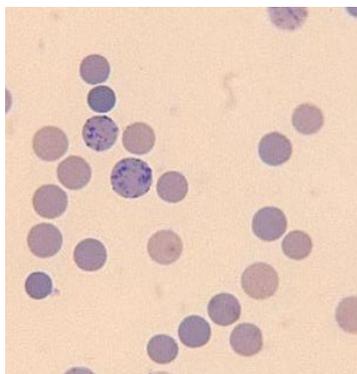
A contagem de reticulócitos permite avaliar a eficácia da medula na produção dos eritrócitos.<sup>16</sup>

Os reticulócitos são precursores dos glóbulos vermelhos. À medida que se dá a maturação dos eritrócitos, o núcleo vai ficando mais condensado até que desaparece. Após a perda do núcleo, estes precursores permanecem na medula óssea durante 2 a 3 dias antes de entrarem na circulação periférica. Durante este período de permanência na medula e o primeiro dia em circulação estes eritrócitos imaturos são denominados reticulócitos. Apesar destas células já não conterem núcleo contêm ribossomas com RNA que se torna visível ao microscópio ótico quando corado com coloração específica. A coloração utilizada no LAC-FFUC para fazer a observação e contagem dos reticulócitos utiliza azul-de-metileno NOVO mas pode também ser usado o azul brilhante de cresil. A mistura do corante com o sangue é incubada a 37 °C, precipitando o RNA ribossomal. (Figura 10). São contados 1000 eritrócitos e respetivo número de reticulócitos.<sup>17</sup>

Sob estímulo da eritropoietina, que pode ocorrer em casos de perda sanguínea, a medula aumenta o número de reticulócitos que são lançados na corrente sanguínea.<sup>17</sup>

Quando se estuda uma anemia e a sua provável etiologia, a contagem de reticulócitos é um exame de 1ª linha, a par das constantes globulares e do estudo morfológico dos eritrócitos. Permite diagnosticar se se trata de uma anemia regenerativa, em que há estimulação da medula e há uma resposta medular com aumento do número de reticulócitos e conseqüente aumento da produção de eritrócitos, ou de uma anemia arregenerativa, em que há um defeito na produção dos eritrócitos e não há um aumento do número de reticulócitos.<sup>16</sup>

O resultado é dado em percentagem e em valor absoluto tendo como gama de referência 0,5 a 1,5 % ou  $25 \times 10^9/L$  a  $90 \times 10^9/L$  em adultos.<sup>16,17,22</sup>



**Figura 10.** Observação ao microscópio de reticulócitos corados com brilhante de cresil.<sup>18</sup>

#### 5.4. Provas de avaliação da hemostase

A hemostase é a sequência de eventos fisiológicos que culmina com o término da hemorragia vascular. Depende do fluxo e vasos sanguíneos, sistema procoagulante, anticoagulantes naturais e sistema fibrinolítico.<sup>23</sup>

O crescente número de indicações para anticoagulação, bem como o aumento do número de anticoagulantes terapêuticos disponibilizados, torna imperativa a compreensão dos testes de coagulação como forma de monitorização destes fármacos.

O Sistema Hemostático protege o sistema vascular e permite que, em caso de lesão, os tecidos sejam reparados e as suas funções restabelecidas.<sup>24</sup>

**Hemostase primária:** Consiste na formação de um coágulo sanguíneo ou trombo plaquetar e tem por objetivo parar a hemorragia que ocorre quando a parede de um vaso é danificada. Este trombo consiste num aglomerado de plaquetas que se forma em torno do local da lesão.<sup>25,26</sup>

**Hemostase secundária:** A coagulação sanguínea é um processo auto-catalítico e auto-limitado que culmina na formação de trombina em quantidades suficientes para a conversão do fibrinogénio em fibrina. Resulta da ativação sequencial dos fatores da coagulação que circulam no plasma na forma inativa (Figura 11).<sup>25,26</sup>

A cascata da coagulação pode ser ativada por duas vias: a **via Intrínseca/de contacto** e a **via Extrínseca/tecidual** convergindo depois para uma via comum. Esta separação só se verifica *in vitro*, uma vez que, na realidade as duas vias não são independentes uma da outra.<sup>25,26</sup>

A **via comum** inicia-se com a ativação do fator X pelo fator IXa e pelo fator VIIIa provenientes da via intrínseca, e pelo fator VIIa da via extrínseca. Esta cascata culmina, então, na conversão de pró - trombina em trombina pelo fator Xa, na presença de cálcio, do fator Va e de fosfolípidos pró - coagulantes (Figura 11).<sup>25,26</sup>

Após a degradação do fibrinogénio pela trombina, libertam-se dois fibrinopeptídeos A e dois fibrinopeptídeos B, dando origem à fibrina solúvel.<sup>25</sup>

A **fibrinólise** é o processo fisiológico pelo qual a fibrina é dissolvida. De modo análogo à coagulação, o sistema fibrinolítico plasmático é constituído por uma série de proteínas (ativadoras e inibidoras) produzidas essencialmente pelo fígado, endotélio vascular e plaquetas, nomeadamente a antitrombina, a proteína C, a proteína S etc.<sup>25,26</sup>

No LAC-FFUC, as provas de coagulação são realizadas no OPTION 4 PLUS Coagulation Analyzer. É um aparelho semi-automático com quatro canais e tem como

princípio a detecção do coágulo através das variações de densidade ótica do meio reacional com agitação magnética constante.

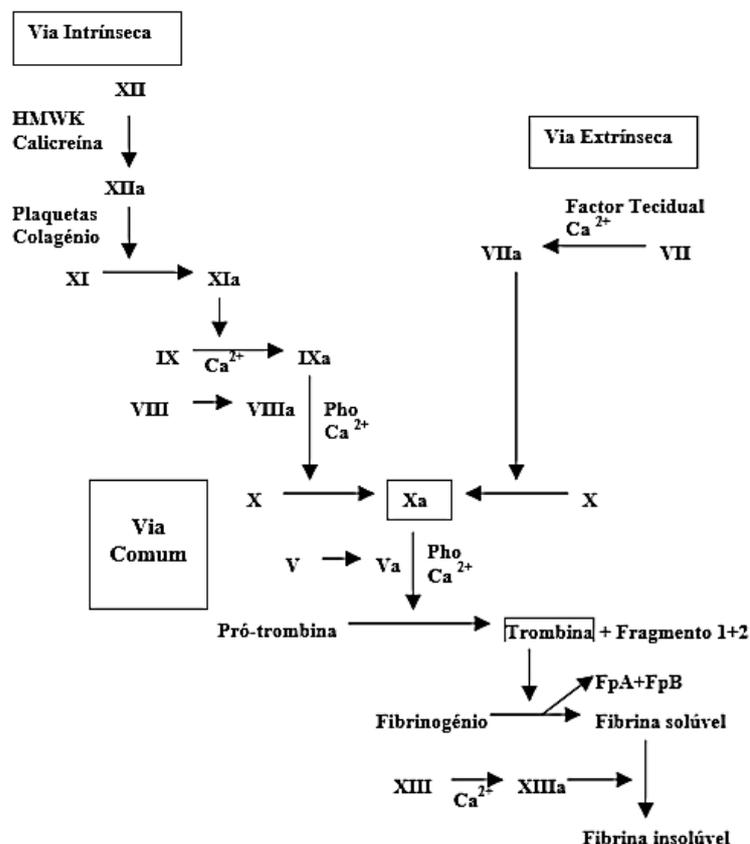


Figura 11. Cascata de coagulação.<sup>24</sup>

#### 5.4.1. Tempo de protrombina (TP) e International Normalized Ratio (INR)

O tempo de protrombina avalia a via extrínseca/tecidual. Esta prova é utilizada como prova clássica de avaliação hemostática, de monitorização de terapêutica com anticoagulantes orais do tipo cumarínico e para avaliação da função hepática.

O plasma é incubado a 37 °C e posteriormente é adicionado reagente (fator tecidual com lípidos e cálcio). A precisão do PT foi questionada, uma vez que existe uma grande variabilidade na sensibilidade dos reagentes de protrombina utilizados na sua determinação. Portanto, para normalizar os efeitos dessa variabilidade e apresentar um valor *standard* foi desenvolvido o International Normalized Ratio (INR).<sup>27</sup>

O valor do INR é obtido pela seguinte fórmula:  $\left(\frac{PT(paciente)}{PT(pad\tilde{r}\tilde{a}o)}\right)^{ISI}$  onde ISI significa Índice de sensibilidade internacional do reagente e o PT (padrão) é o valor de PT do controlo com 100 % de atividade. Os valores de INR para doentes sob medicação com anticoagulantes orais devem situar-se entre 2 e 3. Abaixo do valor mínimo há a possibilidade

de ocorrer a formação de trombos mais facilmente e acima do valor máximo há o risco de hemorragia. Para indivíduos saudáveis os valores de INR situam-se entre 0,9 e 1,2.<sup>17</sup>

O valor do INR aumenta em casos de déficit dos fatores I, II, V, VII e X, deficiência de vitamina K, terapêutica com anticoagulantes ou com heparina em doses elevadas, doença hepática grave, etc. O INR pode estar diminuído em estados pró-trombóticos (como nos períodos pós-parto ou pós-cirúrgico).<sup>24</sup>

#### **5.4.2. aPTT: Tempo de tromboplastina parcial ativada**

O Tempo de tromboplastina parcial ativada é uma prova também realizada no LAC-FFUC e avalia a via intrínseca ou de contato. O reagente utilizado é a cefalina caulino que é adicionado ao plasma e a mistura é incubada, posteriormente é adicionado o  $\text{Ca}^{2+}$  de forma a desencadear a cascata da coagulação e regista-se o tempo que o plasma demora a coagular. O tempo de referência varia entre 30 a 40 segundos.<sup>23</sup>

O aPTT pode estar prolongado em situações como deficiência dos fatores I, II, V, VIII, IX, X, XI, XII, pré-caliceína e cicinogênio de alto peso molecular (HMWK), doença hepática, coagulação intravascular disseminada e transfusões sanguíneas, terapêutica com heparina, anticoagulantes orais (doses altas) e trombolíticos. O aPTT pode estar diminuído em qualquer estado de hipercoaguabilidade.<sup>24</sup>

#### **5.5. Velocidade de sedimentação**

A velocidade de sedimentação corresponde à velocidade a que ocorre separação entre os glóbulos vermelhos e o plasma, que é a parte líquida do sangue, pela ação da gravidade.

A determinação da VS foi realizada recorrendo a uma pipeta de Westergren com uma graduação de 0 a 200 mm, com diâmetro interno de 20.5 mm e capacidade de 1 ml. A pipeta é cheia com sangue total, colocada no suporte na vertical e é feita a leitura após uma hora através da medição da altura da coluna correspondente ao plasma livre de células. O resultado é dado em mm / 1<sup>a</sup> hora.<sup>20</sup>

**Interferências:** Por exemplo, em casos de anemia que alterem a forma das hemácias e a sua capacidade de agregação, este teste pode apresentar um valor abaixo do que seria o esperado.

A inclinação do tubo, variações na temperatura e presença de microcoágulos alteram a os valores normais de hemossedimentação (Tabela 4).

Este parâmetro está aumentado nos processos inflamatórios, infecciosos e neoplásicos. Altera-se também nas doenças autoimunes, enfarto de miocárdio, gravidez e hipotireoidismo, sendo, portanto, um exame inespecífico.

**Tabela 4.** Valores de referência da Velocidade de sedimentação (método de Westergren).<sup>28</sup>

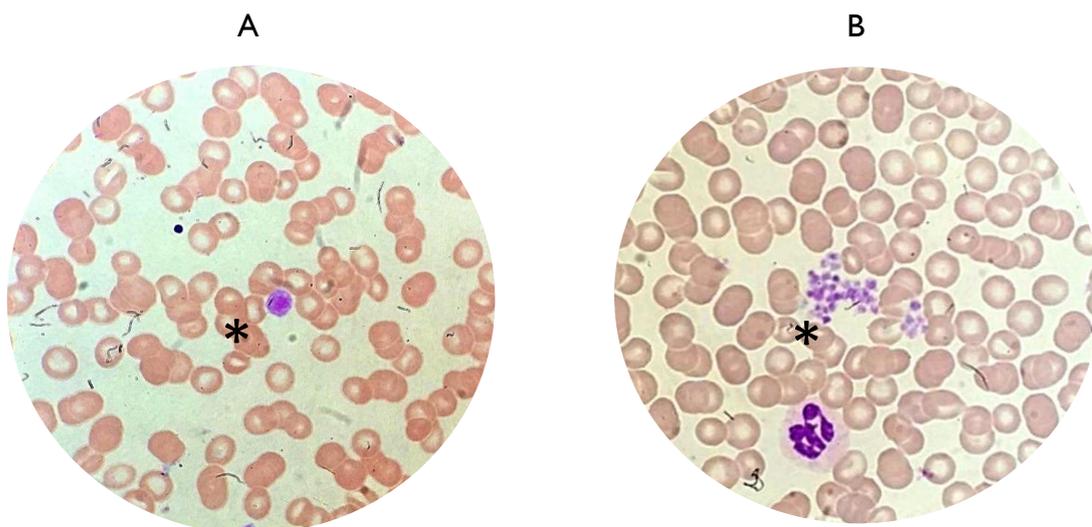
Grupos estários	Sexo	Masculino	Feminino
	Recem-nascidos		< 2 mm
Adultos		< 10 mm	< 20 mm
Idosos		< 40 mm	< 50 mm

## 5.6. Casos clínicos

### Caso I

O hemograma de uma mulher de 47 anos, consumidora crônica de álcool, indicou um valor de plaquetas de  $31 \times 10^9/L$ . Segundo a Direção Geral de Saúde (DGS) a existência de trombocitopenia é uma indicação para a realização de um ESP.

A observação microscópica do ESP permitiu verificar que a baixa contagem de plaquetas não era real devida à presença de plaquetas gigantes e agregados plaquetares (Figura 12).



**Figura 12.** Observação ao microscópio ótico de um esfregaço de sangue periférico realizado após Coloração May Grünwald Giemsa. Observaram-se plaquetas gigantes (A) e agregados plaquetares (B). (foto LAC-FFUC)

As plaquetas resultam da fragmentação do megacariócito e têm como função principal a intervenção no processo hemostático do organismo.<sup>19</sup>

A anisocitose plaquetar resulta da deficiente produção a nível medular das plaquetas o que pode ser causado por um défice de fator estimulador da trombopoiese (trombopoietina que é produzida nos rins e no fígado), situação que está associada a estados de falência hepática que se verifica em certos indivíduos alcoólicos.<sup>19</sup>

## Caso 2

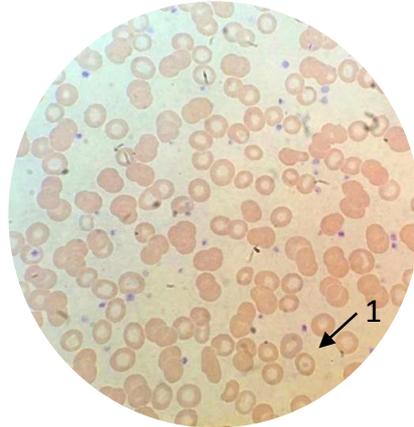
Homem de 21 anos, sem dados clínicos na sua ficha clínica, revelou no hemograma um baixo número de GV e uma anemia (Hb de 103 g/L) classificada como hipocrómica e normocítica (HCM de 26,1 pg e VCM de 26,1 pg) (Tabela 6). Numa primeira análise podíamos suspeitar de uma anemia sideropénica uma vez que o RDW está também bastante aumentado (18,5 %, característico a estas situações). Observou-se também um elevado grau de anisocitose e a contagem de plaquetas foi indicou trombocitose ( $476 \times 10^9/L$ ) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Resultados do hemograma de um homem de 21 anos obtidos após análise no equipamentos HMX Hematology Analyzer.

<b>GB</b>	10,3x10 <sup>9</sup> /L	<b>GV</b>	3,95x10 <sup>12</sup> /L
<b>#NE</b>	6,50x10 <sup>9</sup> /L	<b>Hb</b>	103 g/L
<b>#LI</b>	2,90x10 <sup>9</sup> /L	<b>Ht</b>	0,317 L/L
<b>#MO</b>	0,70x10 <sup>9</sup> /L	<b>VCM</b>	80,3 fl
<b>#EO</b>	0,20x10 <sup>9</sup> /L	<b>HCM</b>	26,1pg
<b>#BA</b>	0x10 <sup>9</sup> /L	<b>CHCM</b>	324 g/L
		<b>RDW</b>	18,5 %
<b>PLT</b>	476x10 <sup>9</sup> /L		

Tendo em conta este quadro de anemia e trombocitose, após repetição do hemograma, confirmaram-se os resultados no ESP (Figura 13).

No ESP foi possível confirmar a anemia pela presença de glóbulos vermelhos com hipocromia. Foram, ainda, encontradas “*Target cells*” (Figura 13). A trombocitose foi também confirmada pelo elevado número de plaquetas presentes por campo.



**Figura 13.** Observação ao microscópio ótico de esfregaço de sangue periférico de um homem de 21 anos após Coloração May Grünwald Giemsa. Confirmou-se a anemia hipocrômica e normocítica e a trombocitose com presença de anisocitose eritrocitária. Destaca-se a observação de uma Target cell (1) (foto LAC-FFUC).

## **6. Microbiologia**

Ao setor da Microbiologia do CoimbraLab chegam vários tipos de produtos biológicos (urina, fezes, exsudados, expetoração, etc.) para proceder à respetiva análise. Este setor é isolado das restantes áreas, com equipamento próprio, nomeadamente estufa de incubação com estudo de verificação de temperatura a 37 °C, dispositivos para obtenção de atmosfera pobre em oxigénio, bico de Bunsen, microscópio ótico, etc.

As técnicas utilizadas para o diagnóstico etiológico das infeções dependem, em grande medida, das características bioquímicas dos microrganismos que se pretendem identificar. Desta forma, o diagnóstico das infeções bacterianas é efetuado mediante exame microscópico e cultura da amostra biológica. Estes procedimentos permitem isolar as espécies bacterianas que estão a causar infeção para depois serem identificadas e estudada a sua sensibilidade a antibióticos. Para se efetuar o estudo microbiológico adequado é fundamental a realização de uma colheita, transporte e conservação adequados.<sup>29</sup>

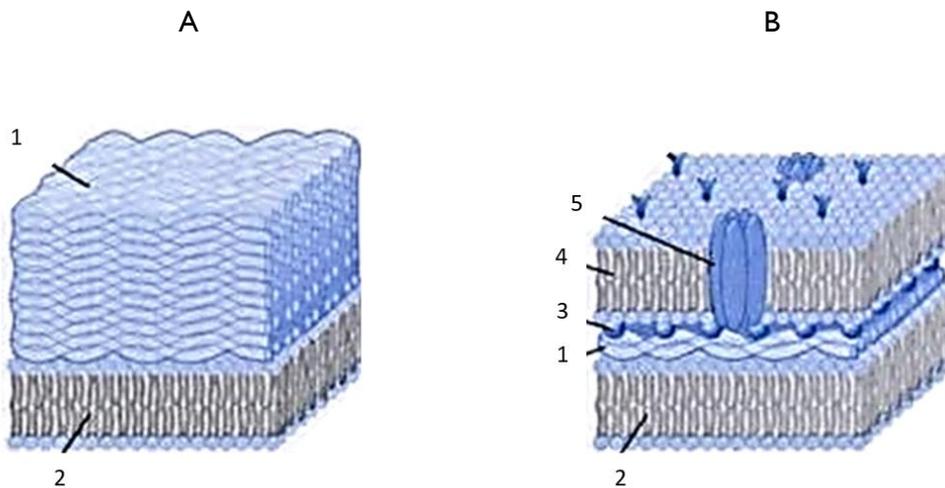
Após a receção no laboratório os produtos são triados e são registadas, caso existam, observações relativamente ao exame macroscópico. Posteriormente é feita a cultura nos meios apropriados e a realização de um esfregaço numa lâmina e coloração de Gram para o exame microscópico.

### **6.1. Coloração de Gram**

A coloração de Gram é uma coloração que permite diferenciar as bactérias em dois grupos, as Gram positivas e as Gram negativas.

O primeiro corante, violeta de genciana, cora todas as bactérias de roxo. Após lavagem com o diferenciador, álcool-acetona, algumas bactérias retêm o corante e outras perdem-no. As que conservam a coloração denominam-se de Gram positivas as que ficam descoradas são as Gram negativas. O segundo corante utilizado é a safranina ou a fucsina diluída que atua como corante de contraste e permite corar de rosa as bactérias que perderam a cor pela atuação do diferenciador.

O comportamento das bactérias à coloração de Gram depende da estrutura da parede celular das bactérias. As bactérias Gram positivas possuem uma parede celular com uma camada espessa de peptidoglicano enquanto nas bactérias Gram negativas a parede celular é constituída por uma camada fina de peptidoglicano e uma membrana externa sobreposta (Figura 14).<sup>29,30</sup>



**Figura 14.** Composição da parede de bactérias Gram positivo (A) e Gram negativo (B). Peptidoglicano (1); a membrana citoplasmática (2); lipoproteínas (3); membrana externa (4); poro (5).<sup>31</sup>

Os corantes utilizados na coloração de Gram são sujeitos a controlo de qualidade aquando da mudança de lote. Para tal realiza-se uma coloração com corantes do lote novo e compara-se com coloração feita com os corantes do lote anterior.

A observação do esfregaço corado é feita ao microscópio (ampliação de 1000 x) e possibilita ver a forma das bactérias (cocos e bacilos) e se adotam algum tipo de agrupamento (pares, em cacho, em cadeia, etc.).

## 6.2. Culturas

Para identificar uma espécie bacteriana é necessário obter uma cultura pura através da qual são avaliadas características macro e microscópicas e as propriedades bioquímicas.<sup>32</sup>

A observação macroscópica das colónias nos meios de cultura inclui avaliação do seu tamanho, forma, textura (mucosa, lisa, rugosa), cor, etc.<sup>29</sup>

Como a maioria das bactérias se duplica a cada 20 a 30 minutos, ao fim de 18 a 24 horas há desenvolvimento suficiente para identificação e posterior estudo da sensibilidade a antimicrobianos.<sup>29</sup>

## 6.3. Meios de cultura

Um meio de cultura é constituído por substâncias que permitem o crescimento bacteriano nomeadamente carbono, azoto, fósforo, potássio, sódio, magnésio entre outros elementos necessários à sua nutrição. O desenvolvimento de um microrganismo depende de diversos fatores entre os quais a disponibilidade de nutrientes, quantidade adequada de oxigénio, grau de humidade, pH e temperatura.<sup>32</sup>

Os meios de cultura podem ser sólidos ou líquidos. Os meios sólidos permitem a individualização das colónias enquanto que os meios líquidos permitem uma melhor difusão de metabolitos, mas não o isolamento de colónias.<sup>32</sup>

Consoante a sua composição os meios de cultura consideram-se enriquecidos, seletivos/de isolamento, diferenciais ou eletivos.<sup>32</sup>

Os meios enriquecidos contêm extratos de carne ou de leveduras e peptona. Os meios seletivos promovem o crescimento dos microrganismos de interesse suprimindo o crescimento de outros. A composição química dos meios diferenciais permite evidenciar características bioquímicas de determinadas bactérias. Os meios eletivos também chamados de caldos de enriquecimento são meios que pela sua composição, favorecem o crescimento de uma espécie em detrimento de outra num determinado tempo.<sup>32</sup>

Os meios mais usados no CoimbraLab durante o meu estágio foram:

**Gelose chocolate + PolyViteX:** Meio enriquecido, não seletivo obtido a partir da gelose Columbia, pelo aquecimento da mistura com sangue a 80 °C levando à hemólise dos eritrócitos. A hemoglobina e o PolyViteX fornecem os fatores X (hemina) e V (NAD). Favorece o crescimento de microrganismos fastidiosos como é o caso de *Neisseria spp.* e *Haemophilus spp.*<sup>3</sup>

**Gelose Hektoen:** Meio seletivo e diferencial para o isolamento de *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* Os sais biliares inibem os Gram positivo e retardam o crescimento de algumas *Enterobacteriaceae*.<sup>3</sup>

**Meio de MacConkey:** Meio seletivo e diferencial para isolamento de bacilos Gram negativo (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.*, etc.). Os sais biliares e o cristal violeta inibem o crescimento da maioria das bactérias Gram positivo. A presença de lactose permite diferenciar as bactérias fermentadoras das não fermentadoras. Microrganismos fermentadores da lactose originam colónias rosas a vermelhas, por vezes contornadas por um halo de sais biliares. Os microrganismos que não fermentam a lactose dão origem a colónias incolores.<sup>3</sup>

**Caldo Selenito:** Meio líquido de enriquecimento para *Salmonella spp.* O selenito de sódio inibe a maioria das *Enterobacteriaceae*, incluindo algumas estirpes de *Shigella spp.*<sup>3</sup>

**Columbia agar + 5% sheep blood:** Meio de isolamento que facilita o crescimento de microrganismos mais exigentes. A adição de sangue de carneiro torna o meio nutritivo muito rico adaptado ao crescimento da maioria das espécies bacterianas. A presença de sangue permite a observação da hemólise ( $\alpha$  ou  $\beta$  hemólise) que é um aspeto fundamental para a orientação da identificação bacteriana.<sup>3</sup>

**Gelose ChromID CPS- elite:** Meio cromogénio que permite a identificação imediata de *E. coli* e uma identificação presuntiva de algumas bactérias tal como *Klebsiella spp*, *Enterococcus spp* e *Proteus spp*. A gelose é constituída por uma base muito rica em peptonase substratos cromogénicos que permite a deteção de atividade enzimática específica. A deteção do indol é feita pela presença de triptofano na gelose e a elevada concentração de agar evita a invasão por *Proteus spp*.<sup>33</sup>

**Gelose ChromID Candida:** Meio cromogénio que permite o isolamento e identificação direta de *Candida albicans*. Esta espécie adquire coloração azul pela hidrólise de um substrato cromogénico (que é a patente da bioMérieux) específico da enzima hexosaminidase. Também faz a identificação preliminar de outras espécies como *Candida tropicalis*, *Candida kefyr* e *Candida lusitaniae*, que apresentam coloração rosa pela hidrólise de um substrato da  $\beta$  glucosidase.<sup>34</sup>

**Caldo ChromID Granada Biphasic:** Meio seletivo utilizado para a deteção e a identificação direta de *Streptococcus agalactiae*. É constituído por uma base nutritiva que associa peptonas, piruvato e glucose. A presença de metotrexato, soro de cavalo e amido permite a produção de um pigmento cor de tijolo específico de estreptococos do grupo B.<sup>3</sup>

#### **6.4. Produtos biológicos**

No CoimbraLab os produtos biológicos mais frequentes são urinas e fezes. As expetorações e o sangue são raros e durante o meu estágio só foi realizada uma hemocultura.

Dependendo do produto biológico a pesquisa é orientada para determinados microrganismos tendo em atenção os potenciais agentes patogénicos e a flora comensal (Tabela 6).

**Tabela 6.** Microrganismos mais comuns na flora comensal e potenciais patogénicos no Homem.<sup>29</sup>

<b>Zona</b>	<b>Microrganismos comensais</b>	<b>Potenciais patogénicos</b>
Trato respiratório	Nariz e nasofaringe: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , Difteroides, <i>Haemophilus parainfluenzae</i> , <i>Streptococcus spp</i> , etc. Orofaringe: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , etc.	Nariz e nasofaringe: <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , etc. Orofaringe: Estreptococos do grupo A, <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Bordetella pertussis</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>S. aureus</i> .
Trato gastrointestinal	Enterobacteriaceae ( <i>Escherichia coli</i> , etc.) <i>Enterococcus spp</i> , <i>Bacteroides spp</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Clostridium spp</i> , etc.	<i>Salmonella spp.</i> , <i>Shigella spp.</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Clostridium difficile</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , etc.
Trato genito-urinário	<i>Lactobacillus spp</i> , <i>Bacteroides spp</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , etc.	<i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus spp.</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Neisseriae gonorrhoea</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> , etc.

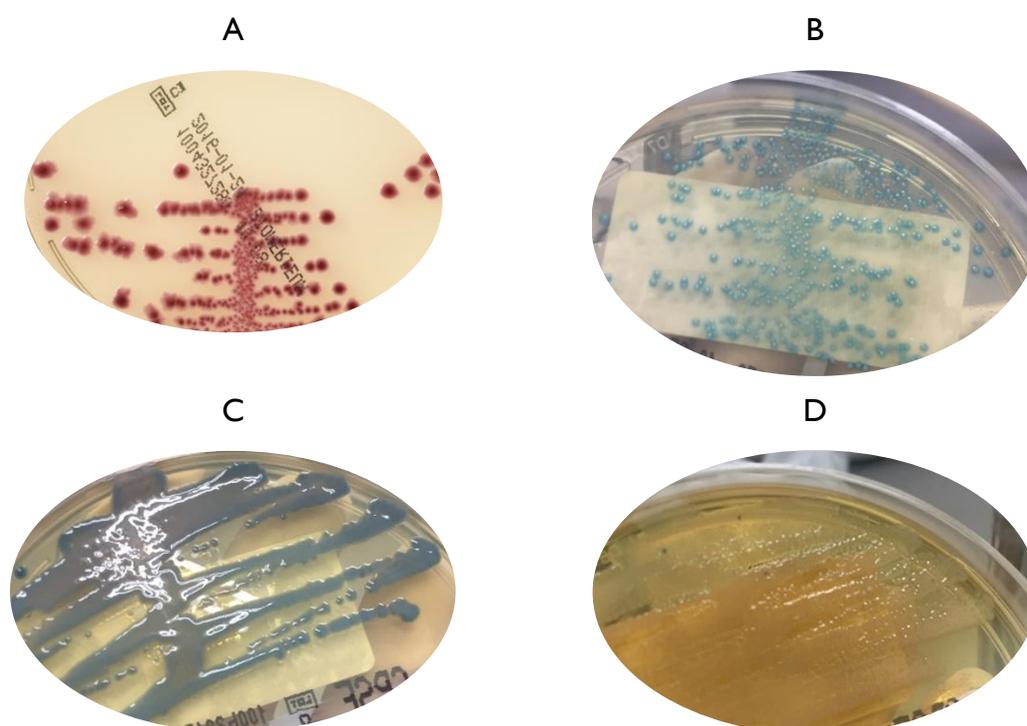
#### 6.4.1. Urina

A urina é o produto mais frequente na área de microbiologia do CoimbraLab.

As infeções do aparelho urinário são muito frequentes no Homem. Na infeção urinária aguda, geralmente as bactérias da flora intestinal saprófita invadem o aparelho urinário por via ascendente através da uretra. Os agentes etiológicos mais frequentes nas crianças e adultos, sem outras doenças associadas, são as Enterobactérias, em particular *Escherichia coli*. Em doentes internados e com fatores de risco como algaliação permanente, cálculos urinários e outras patologias do aparelho urinário, aumenta a possibilidade de contrair infeção urinária por outros agentes etiológicos como *Pseudomonas spp*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Enterococcus spp* e fungos. Estes últimos particularmente em doentes que estão sob terapêutica antibiótica.<sup>3</sup>

A urina é colhida em recipiente estéril e a urocultura realizada imediatamente após a chegada do produto ao laboratório. A urina é homogeneizada e semeada em meio apropriado utilizando uma ansa calibrada de 10 µl que é mergulhada verticalmente na urina não centrifugada. No CoimbraLab a urina é semeada no meio ChromID CPS-elite que é um meio sólido cromogénio,. A placa é depois incubada em atmosfera de aerobiose a 37 +/- 0,5 °C durante 18 a 24 horas. O meio permite uma identificação imediata de *E. coli* e uma identificação presuntiva de algumas bactérias tal como *Klebsiella spp*, *Enterococcus spp* e *Proteus spp*.

As colónias de *E. coli* adquirem coloração vermelho a carmim devido à produção de  $\beta$ -glucuronidase e/ou  $\beta$ -galactosidase, enzimas responsáveis pela hidrólise de hidratos de carbono. As colónias de *Enterococcus spp* adquirem uma coloração turquesa ou azul claro a verde pela produção de  $\beta$ -glucosidase, enzima responsável pela hidrólise de hidratos de carbono. As espécies dos géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Citrobacter* (KESC) adquirem um tom azul a verde pela produção de  $\beta$ -glucosidase e são muito mucosas o que as permite distinguir de *Enterococcus*. As espécies dos géneros *Proteus*, *Providencia* e *Morganella* adquirem um tom castanho difuso pela produção de desaminase, responsável pela hidrólise de aminoácidos (Figura 15).



**Figura 15.** Observação macroscópica de colónias presuntivas de *E.coli* (A), *Enterococcus spp* (B), *Klebsiella spp* (C) e *Proteus spp* (D) em ChromID CPS – elite. Cultura de 24 horas a 37 °C (B, C e D: fotos CoimbraLab. A: retirado de <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/9-chromid-cps-elite>).

Segundo os critérios de Kass, uma contagem de colónias  $> 10^5$  é indicativo de infeção urinária. No entanto, a valorização deste resultado tem de ter em conta uma série de parâmetros tais como o método de colheita da urina (punção supra - púbica, micção, punção de cateter urinário, etc.), tipo de doente (criança, idoso, acamado, etc.), sintomatologia, observação microscópica do sedimento urinário e resultados de exames bacteriológicos anteriores.<sup>3</sup>

Se a colheita tiver sido por micção e se há crescimento de duas ou mais estirpes bacterianas, considera-se que houve contaminação durante a colheita da urina ou um atraso

no transporte e/ou no processamento laboratorial da mesma. Nesta situação é requisitada nova colheita de urina.<sup>3</sup>

Numa amostra de urina colhida por punção supra - púbica deverão ser valorizadas quaisquer espécies de bactérias isoladas, independentemente da sua quantificação.<sup>3</sup>

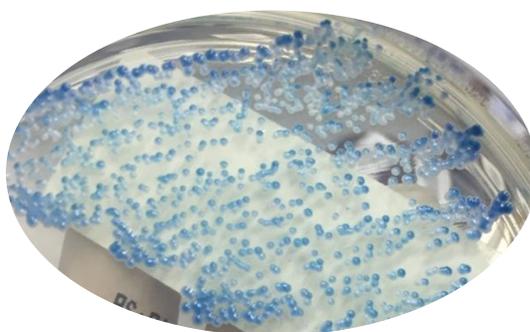
No CoimbraLab é sempre feita a análise bioquímica da urina. Esta análise é realizada num aparelho automático, o Aution Max AX-4280 Arkray, que utiliza uma tira teste que é emergida na urina. A leitura é feita automaticamente e são avaliados os seguintes parâmetros: aspeto, densidade, turbidez, leucócitos, eritrócitos, nitritos, ácido ascórbico, glucose, proteínas, bilirrubina, urobilinogénio, corpos cetónicos e pH.

Por último deve ser observado ao microscópio o sedimento urinário, após centrifugação da urina, de modo a avaliar a presença de células epiteliais, eritrócitos, leucócitos, cristais, cilindros, parasitas e leveduras (Figura 16).



**Figura 16.** Observação microscópica de leveduras num sedimento urinário (ampliação de 400x) (foto CoimbraLab).

No LCC, quando se observam leveduras no sedimento é feita sempre cultura em gelose ChromID Candida (CAN). Neste meio as colónias de *Candida albicans* adquirem a cor azul (Figura 17).



**Figura 17.** Observação de colónias azuis características de *Candida albicans* em Gelose ChromID Candida. Cultura de 24 horas a 37 °C (foto CoimbraLab).

No sedimento urinário são também pesquisadas as formas vegetativas de *Trichomonas vaginalis*. Este parasita é um protozoário flagelado pelo que o exame a fresco é útil para avaliação da sua forma e mobilidade. A presença deste flagelado na urina é devido à contaminação uma vez que normalmente aparece nos exsudados vaginais.<sup>35</sup>

#### 6.4.2. Fezes

As infecções do aparelho gastrointestinal têm uma elevada incidência na população em geral e apresentam grande morbidade em determinados grupos etários nomeadamente crianças e idosos.

Nas fezes as bactérias mais pesquisadas são *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* e *Campylobacter spp.*

**Pesquisa de *Campylobacter spp.*:** *Campylobacter jejuni* é uma causa frequente de diarreia. Possui um mecanismo de ação invasivo e produz uma toxina termoestável. A bactéria atravessa o epitélio intestinal, causa inflamação na lâmina própria e pode ser responsável por bacteriémias. Na infecção gastrointestinal é frequente a diarreia com a duração de uma semana e raramente provoca febre, mialgias e dor abdominal. Pode ser transmitida pessoa a pessoa mas as fontes habituais são a água e alimentos contaminados.<sup>32</sup>

Para pesquisar esta bactéria a amostra é cultivada em Meio *Campylobacter* e incubada 48 horas a 42 °C, em microaerofilia. A identificação presuntiva de *Campylobacter spp.* baseia-se no crescimento em condições seletivas (atmosfera e temperatura), morfologia microscópica das bactérias (bacilos finos em forma de “s”) e positividade nos testes de oxidase e catalase.<sup>36</sup>

**Pesquisa de *Salmonella spp.* e *Shigella spp.*:** Só é reconhecida uma espécie de Salmonela, a *Salmonella enterica* mas são conhecidos mais de 2500 serótipos. Esta bactéria pode ser dividida em dois grupos salmonelas entéricas que originam quadros de gastroenterite e salmonelas tíficas que dão origem a quadros febris.<sup>32</sup>

As salmonelas entéricas são a causa mais frequente de diarreia infecciosa em todo o mundo e são transmitidas ao homem por alimentos e água contaminados. A dose infetante é entre 10.000 a 100.000 bactérias. A diarreia é provocada devido à invasão da mucosa do intestino delgado com conseqüente lesão do epitélio e associada à produção de uma enterotoxina. A intensidade do quadro clínico é proporcional à quantidade de bactérias ingeridas. A infecção é caracterizada por um período de incubação de 12 a 48 horas, diarreia durante 2 a 6 dias e um quadro com dores abdominais, vômitos, febre e cefaleias.<sup>32</sup>

As quatro espécies de *Shigella spp.* (*S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. sonnei*) são responsáveis pelo desenvolvimento da desenteria bacilar. A espécie *S. sonnei* é a mais comum e a transmissão pode ocorrer pessoa a pessoa, através de água, alimentos e fómites. A dose infecciosa é bastante baixa, 100 bactérias. Estas bactérias invadem a parede intestinal e produzem uma enterotoxina que origina a perda de água e eletrólitos, originando diarreia aquosa com muco e sangue. O quadro clínico é caracterizado por febre, dor abdominal e diarreia.<sup>32</sup>

Para pesquisa de *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* nas fezes é feita a sementeira em gelose Hektoen e caldo Selenito. Este é um caldo de enriquecimento e após 4 horas de incubação é repicado para gelose Hektoen que é incubada em aerobiose a 37 °C, durante 18 a 24 horas.

As colónias de *Salmonella spp.* aparecem verdes com ou sem centro negro devido à produção de sulfureto de hidrogénio (Figura 18). As colónias de *Shigella spp.* ficam incolores.<sup>36</sup>

Se o médico pedir a pesquisa de *Escherichia coli* enteropatogénica é feita também a sementeira em MacConkey.



**Figura 18.** Observação macroscópica de colónias de *Salmonella spp.* em Hecktoen. Cultura de 24 horas a 37 °C (foto CoimbraLab).

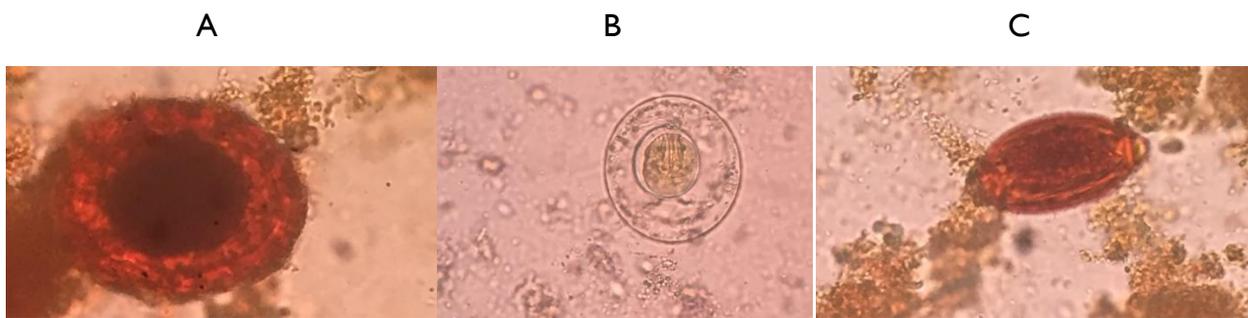
Nas fezes é também realizado o exame parasitológico para pesquisa de ovos, larvas e parasitas intestinais. As fezes são o produto mais comum em pedidos de exames parasitológicos. Existem duas etapas essenciais associadas a este procedimento: o exame macroscópico e o exame microscópico da amostra fecal.<sup>35</sup>

No exame macroscópico é avaliada a consistência, a cor e verifica-se a presença de elementos anormais como é o caso de muco, sangue, vermes adultos ou parte deles.<sup>35</sup>

Assim como em todas as áreas laboratoriais, a qualidade dos resultados depende da colheita adequada da amostra. Como as formas parasitárias são eliminados de forma

intermitente, recomenda-se a colheita de múltiplas amostras fecais (três amostras colhidas em dias alternados).<sup>35</sup>

No CoimbraLab é utilizado um *kit* para preparação de fezes que associa o método de sedimentação e o método de concentração de Ritchie. Esta técnica consiste em dissolver a amostra fecal numa solução de formalina 10 %. Após obter a suspensão é adicionado éter e a mistura é filtrada para um tubo cónico e centrifugada. O sobrenadante é desprezado e o sedimento homogeneizado e observado ao microscópio. No CoimbraLab é sempre adicionado lugol uma vez que ajuda a ver os quistos dos parasitas (Figura 19).



**Figura 19.** Observação ao microscópio ótico de um parasitológico de fezes. *Ascaris lumbricoides* (A), ovo de *Hymenolepis nana* (B) e ovo de *Trichuris trichiura* (C). Preparação corada com lugol (ampliação 400x). (foto CoimbraLab).

#### 6.4.3. Exsudados nasais e faríngeos

A flora comensal do aparelho respiratório superior é abundante e constituída por microrganismos aeróbios e anaeróbios. Microrganismos como *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *H. influenzae*, *N. meningitidis*, leveduras e algumas enterobactérias podem constituir uma flora transitória ou estar presente em pequeno número na orofaringe de indivíduos saudáveis passando a ter um papel patogénico quando o seu número aumenta.<sup>3</sup>

Para avaliação de infeções no trato respiratório superior chegam ao laboratório exsudados nasais e exsudados faríngeos.

Estes produtos são cultivados em gelose de sangue (COS), gelose chocolate (PVX) e MacConkey. A gelose PVX é incubada em atmosfera 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C durante 24 horas, a gelose COS e MacConkey são incubadas em aerofilia a 37 °C durante 24 horas. Para pesquisar fungos é feita a sementeira em gelose CAN. Após incubação avalia-se o crescimento de colónias características e a existência de hemólise em gelose COS. O desenvolvimento de  $\beta$ -hemólise é sugestivo de *S. pyogenes* que é o responsável por mais de 90 % das faringites bacterianas.<sup>37</sup>

Nos exsudados nasais é importante ter em conta a presença de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina. A metilina é um antibiótico muito usado para o tratamento das infeções hospitalares, pertence ao grupo das penicilinas ( $\beta$ -lactâmicos) e atua na parede celular bacteriana. Devido ao grande potencial de disseminação e alta mortalidade, a espécie *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) é uma bactéria considerada um problema de saúde pública.<sup>38</sup>

#### 6.4.4. Expetoração

O grande problema no diagnóstico das infeções respiratórias inferiores é a contaminação das amostras por bactérias da flora comensal da orofaringe durante a colheita. O laboratório deve processar apenas as amostras de boa qualidade.

São vários os produtos que podem ser utilizados nomeadamente, secreções brônquicas, lavado brônquico, lavado bronco-alveolar, aspirado pulmonar, expetoração etc. No entanto, o mais comum no CoimbraLab é a expetoração e o único que acompanhei durante o meu estágio.

A expetoração deve ser a primeira da manhã, obtida por tosse profunda e colhida em recipiente estéril.<sup>3</sup>

De forma a avaliar a qualidade da amostra é efetuado um esfregaço e corado pelo método de Gram. A observação ao microscópio ótico é feita com objetiva 10 x (cerca de 10 campos). A expetoração é classificada segundo o critério de Murray e Washington (Tabela 7). Segundo este critério só são processadas as amostras que se englobem nos grupos 4 e 5.<sup>3</sup>

A expetoração é cultivada em COS, gelose chocolate seletiva para *Haemophilus spp.* e MacConkey e incubada em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> a 35 °C durante 18 a 24 horas.

**Tabela 7.** Classificação da expetoração segundo o critério de Murray e Washington.<sup>36</sup>

	<b>Células epiteliais / (ampliação 100 x)</b>	<b>Leucócitos / (ampliação 100 x)</b>
<b>Grupo 1</b>	25	10
<b>Grupo 2</b>	25	10-25
<b>Grupo 3</b>	25	25
<b>Grupo 4</b>	10-25	25
<b>Grupo 5</b>	< 10	25

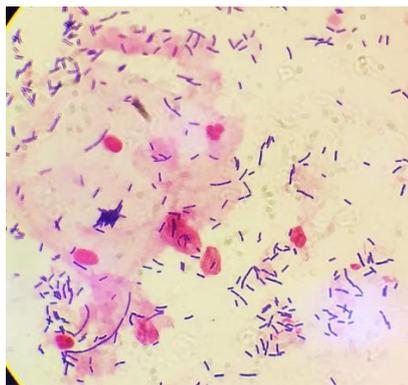
#### 6.4.5. Exsudado vaginal ou uretral

Algumas infecções do aparelho genital feminino são devidas a microrganismos endógenos cuja patogenicidade é ativada por fatores do hospedeiro ou por desequilíbrio da flora saprófita.<sup>3</sup>

Os exsudados vaginais ou uretrais são colhidos com zaragatoa e transportados em meio não nutritivo (amies ou stuart's).<sup>3</sup>

O processamento da amostra compreende sempre um exame a fresco e um após coloração de Gram.

O exame a fresco permite avaliar a presença de *Trichomonas vaginalis* e de elementos leveduriformes. Na coloração de Gram é possível visualizar células epiteliais e bacilos Gram positivo (flora comensal) (Figura 20). Deve ser feita a pesquisa de leveduras, diplococos Gram negativo com a forma característica de grãos de café, sugestivo de *Neisseriae spp.* e bacilos de Gram negativo intracelulares sugestivos de *Gardnerella vaginalis*.



**Figura 20.** Observação ao microscópio óptico do exsudado vaginal corado pelo Gram: observação de células epiteliais e bacilos Gram positivo (ampliação de 1000x). (foto CoimbraLab).

Os exsudados vaginais ou uretrais são cultivados em gelose COS, gelose PVX, MacConkey e gelose CAN. A gelose COS e o MacConkey são incubados em aerofilía a 37 °C durante 24 horas. A gelose PVX é incubada em atmosfera com 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C durante 24 horas. A gelose CAN é incubada a 37 °C, durante 24 horas mas após este período se não se observar crescimento prolonga-se a incubação até às 48 horas.

Na gelose de COS a pesquisa é direcionada para estreptococos β-hemolítico (*S. agalactiae*). Na gelose PVX é pesquisada *Neisseriae spp.*, no MacConkey enterobactérias e na gelose CAN a levedura *Candida albicans*.<sup>32</sup>

Em mulheres grávidas é efetuado o rastreio para pesquisa de *Streptococcus agalactiae*. Neste caso, a pesquisa é feita através da inoculação da amostra em caldo chromID Granada

que é um meio seletivo para o isolamento de *S. agalactiae*. É constituído por uma base nutritiva que associa uma peptona, piruvato e glucose. A presença de metotrexato, soro de cavalo e amido permite a produção de um pigmento laranja avermelhado específico de estreptococos hemolíticos do grupo B (Figura 21).



**Figura 21.** Caldo chromID Granada positivo para a pesquisa de *Streptococcus agalactiae* (foto CoimbraLab).

#### **6.4.6. Exsudado purulento**

Os exsudados purulentos podem ser provocados por vários os microrganismos devido a várias situações clínicas.

Tendo em conta as múltiplas variáveis envolvidas, a metodologia adotada para o estudo microbiológico do exsudado purulento tem de ter em consideração o local anatómico da infeção, a história clínica e o modo de colheita. No presente relatório apenas vai ser abordado o processamento laboratorial para exsudados de lesões fechadas e exsudados de lesões abertas pois foram com os que eu trabalhei durante o estágio.<sup>3</sup>

A amostra é colhida com uma seringa estéril e depois é transferida para recipiente esterilizado. No entanto o produto pode ser enviado ao laboratório na própria seringa com que foi colhido desde que exista forma de fechar a seringa com tampa estéril não perfurante ou cortante.<sup>3</sup>

**Exsudados de lesões fechadas:** A colheita dos exsudados profundos deve ser realizada por punção e aspiração com agulha e seringa.<sup>3</sup>

**Exsudados de lesões abertas:** Quando não há alternativa o exsudado pode ser colhido com zaragatoa humedecida e deve ser colocada em meio de transporte (Stuart ou Amies).<sup>3</sup>

No CoimbraLab as amostras são cultivadas em COS, MacConkey e PVX. A gelose COS e o MacConkey são incubados em aerofilia a 37 °C durante 24 horas. A gelose PVX é incubada em atmosfera com 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C durante 24 horas. Na gelose PVX sé feita a pesquisa de *Haemophilus spp.* e *Neisseriae spp.*, no MacConkey são pesquisadas bactérias Gram negativo e na gelose COS é valorizada a hemólise.

#### **6.4.7. Sangue**

O sangue é um produto biológico estéril pelo que o isolamento de um determinado microrganismo a partir duma hemocultura é, geralmente, o agente etiológico da infeção.<sup>3</sup>

A colheita do sangue para hemocultura é efetuada por punção venosa de uma das veias periféricas. Quando é realizada mais do que uma hemocultura devem efetuar-se sequencialmente colheitas de diferentes veias periféricas. Não é recomendada a colheita de sangue por punção de cateter intravenoso (I.V) exceto quando não é possível a punção de veia periférica. Nestes casos o laboratório tem de ser informado desta situação, essencial para a interpretação do resultado.<sup>3</sup>

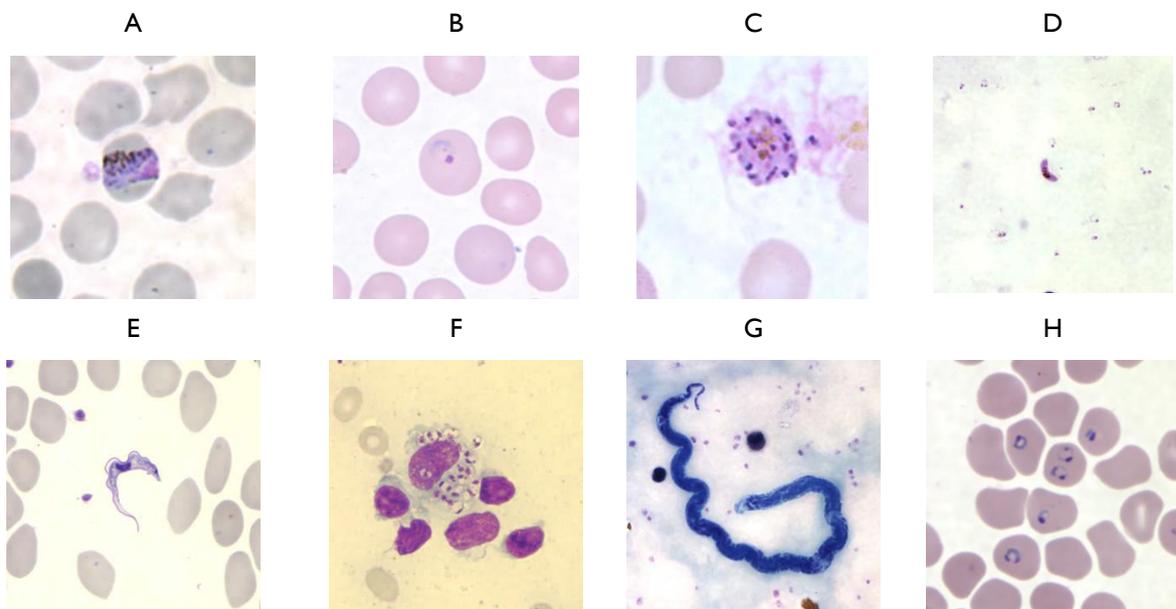
O volume de sangue colhido por frasco de cultura deve respeitar a proporção recomendada pelo fabricante em relação ao meio de cultura. Nas crianças a concentração dos microrganismos durante o período de bacteriémia é muito mais alta do que nos adultos e por isso são necessários volumes menores de sangue. Os volumes recomendados são de 1 a 5 ml para crianças e 10 a 30 ml para adultos.<sup>3</sup>

O meio de cultura contém polianetolsulfato de sódio (SPS) que é um inibidor químico e anticoagulante. Inibe a atividade bactericida do soro e a fagocitose, inativa o complemento e neutraliza lisozimas. A deteção do crescimento bacteriano na hemocultura é efetuada pela medição do CO<sub>2</sub> produzido.<sup>3</sup>

A confirmação de microrganismos é feita através da coloração de Gram e pela cultura em gelose de sangue (COS) que é realizada caso haja produção de CO<sub>2</sub>. O patologista valoriza estes resultados de acordo com o histórico clínico do doente. Caso existam dúvidas deve esperar-se pelo resultado da segunda hemocultura, colhida a partir de uma segunda punção num braço diferente da primeira. As bactérias mais frequentemente isoladas no laboratório foram *S. aureus*, *S. agalactiae*, *E. coli* e *Klebsiella spp.*

A análise parasitológica em amostras de sangue é realizada em sangue total com anticoagulante e é efetuada após a realização de um esfregaço numa lâmina seguido de coloração May Grünwald Giemsa.

O esfregaço de sangue periférico é observado ao microscópio ótico (ampliação 1000 x) de forma a detetar a presença ou ausência de parasitas (Figura 22) bem como o grau de parasitémia, no caso da infeção pelo *Plasmodium spp.*



**Figura 22.** Observação microscópica de alguns parasitas sanguíneos. Trofozoíto de *Plasmodium malariae* (A), trofozoíto de *Plasmodium vivax* (B), esquizonte de *Plasmodium ovale* (C), gametócito de *Plasmodium falciparum* (D), forma tripomastigota de *Trypanosoma brucei* (E), forma amastigota de *Leishmania spp* (F), *Loa loa* (G), trofozoítos de *Plasmodium falciparum* (H).<sup>39</sup>

## 6.5. Identificação dos microrganismos

A identificação de microrganismos é realizada sempre que se observe crescimento microbiano, de valorizar, nos meios de cultura. Baseia-se em características fenotípicas, tendo em conta aspetos macroscópicos e microscópicos, características de crescimento e propriedades metabólicas. A identificação correta dos microrganismos tem enorme importância no diagnóstico da infeção e na escolha do tratamento adequado.

### 6.5.1. Métodos automatizados

No CoimbraLab é utilizado o Vitek II Compact para identificação de bactérias e realização dos respetivos testes de sensibilidade a antimicrobianos.

A identificação baseia-se em características metabólicas e no perfil bioquímico dos microrganismos. Todas as etapas como a inoculação, a leitura e a gravação de resultados são automatizadas no Vitek II Compact.<sup>40</sup>

Para cada microrganismo isolado nos meios de cultura (gelose CPS-elite, gelose COS, MacConkey, gelose PVX, etc.) é necessário preparar previamente duas suspensões. A primeira é feita colocando o inóculo em solução salina, com a densidade variável consoante a bactéria: Gram negativo 0.60-0.63 McFarland e Gram positivo 0.65-0.68 McFarland. A segunda é feita a partir de uma diluição, em 3 ml de solução salina, da primeira suspensão. No caso de bactérias Gram negativo são usados 145 µl da primeira suspensão, para bactérias Gram positivo são usados 280 µl. A primeira suspensão é utilizada para a identificação e a segunda para a realização do antibiograma.

As cartas de identificação e de sensibilidade e as suspensões microbianas são introduzidas no equipamento e no interior são transportadas para uma câmara de vácuo que permite a aspiração da suspensão e a inoculação nos poços das cartas respetivas. Se o microrganismo a isolar for Gram negativo são utilizadas cartas GN, se se tratar de um Gram positivo são utilizadas cartas GP.

O controlo da solução salina utilizada, para realização das suspensões, é realizado semanalmente e sempre que se muda o lote da solução. Para tal é feita a sementeira em gelose Columbia + 5 % sangue de carneiro. A ausência de crescimento indica que a solução salina é estéril.

Contudo, os testes automatizados dependem, em parte, de procedimentos manuais que orientam a identificação do microrganismo.

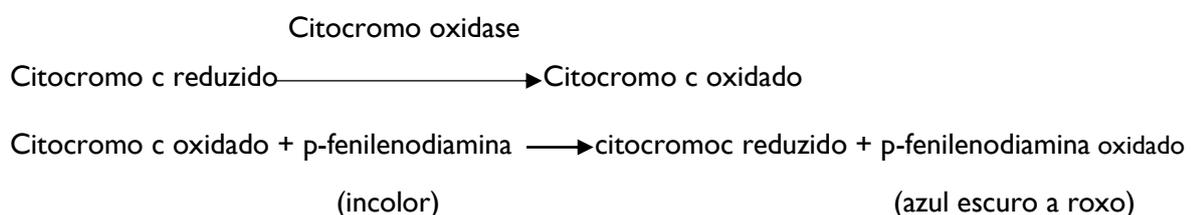
### 6.5.2. Testes manuais

#### Prova da oxidase

A prova da oxidase pesquisa as citocromo-oxidases bacterianas. Estas enzimas atuam no final da cadeia respiratória transferindo iões hidrogénio ( $H^+$ ) para o oxigénio ( $O_2$ ). O teste permite distinguir os bacilos não fermentadores, oxidase positiva, das enterobactérias, oxidase negativa.<sup>29</sup>

O teste utiliza como reagente de leitura o p-fenilenodiamina. A oxidação deste composto leva ao aparecimento de cor azul escuro a roxo, segundo as reações:

Nesta prova não devem ser usadas ansas de metal ou colónias provenientes de gelose de sangue levando a falsos positivos.<sup>31</sup>



## Pesquisa da Catalase

A prova da catalase baseia-se na hidrólise do peróxido de hidrogénio pela catalase. Esta prova é utilizada na diferenciação de estafilococos e estreptococos. Os primeiros são positivos para esta prova enquanto que os segundos são negativos.<sup>29</sup>

Uma colónia proveniente de uma cultura de 18 a 24 horas é colocada sobre uma placa de Petri ou uma lâmina e é adicionada uma gota de peróxido de hidrogénio. Se a bactéria possuir a enzima catalase ocorre a libertação de oxigénio que é observada pelo aparecimento de bolhas, segundo a reação:<sup>29</sup>



## Slidex Staph Plus

O Slidex Staph Plus é um teste rápido de aglutinação e é utilizado para identificar *Staphylococcus aureus*.<sup>3</sup>

O reagente "Slidex Staph Plus" engloba partículas de látex sensibilizadas com fibrinogénio humano e anticorpos monoclonais que permite a deteção do fator de afinidade para o fibrinogénio, da proteína A e de um antígeno de superfície de *S. aureus*. Quando se verifica aglutinação, o teste é dado como positivo e indica que estamos na presença de *S. aureus* (Figura 23).<sup>38</sup>



**Figura 23.** Identificação de *Staphylococcus aureus* através do teste de aglutinação Slidex Staph Plus. (foto CoimbraLab).

## Teste Rápido de Deteção de Antígenos (TDAR)

O teste rápido de deteção de antígenos (TDAR) é utilizado para pesquisa de *Streptococcus Pyogenes* que é Streptococos do grupo A de Lancefield.

*S. pyogenes* é o agente bacteriano mais frequentemente encontrado na amigdalite aguda. A amigdalite aguda ocorre predominantemente em idade escolar e tem como sintomas início súbito de odinofagia, febre (> 38 °C), vômitos, dor abdominal e cefaleia. O TDAR é uma boa alternativa ao exame cultural uma vez que se obtêm os resultados em menos tempo.<sup>41</sup>

No CoimbraLab o TDAR utilizado baseia-se na extração ácida ou enzimática do antígeno da parede celular de *S. pyogenes* (hidrato de carbono específico) e sua detecção posterior por imunocromatografia.

## 6.6. Suscetibilidade a antimicrobianos

A suscetibilidade a antimicrobianos é determinada pela capacidade de um agente antimicrobiano inibir, *in vitro*, o crescimento microbiano.

Os resultados dos testes de suscetibilidade antimicrobiana *in vitro* são importantes para selecionar o tratamento adequado contra o microrganismo infetante.

No CoimbraLab a avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos é realizado no mesmo equipamento onde são realizadas as identificações, o Vitek II Compact. O equipamento mede a atividade antimicrobiana por métodos quantitativos (Concentração Mínima Inibitória, CMI) e qualitativos (Resistente, Intermédio, Sensível). Utilizam-se cartas de sensibilidade cujos poços contêm antimicrobianos em concentrações conhecidas e direcionadas para um grupo específico de microrganismos. A inibição do crescimento é evidenciada pela ausência de turvação no meio. O software do Vitek faz uma comparação dos resultados obtidos com uma base de dados e faz correções se surgir algum resultado discrepante. (Tabela 8).

Os perfis de suscetibilidade enviados ao clínico dependem do microrganismo, do produto biológico bem como da idade do hospedeiro (Anexo IV).

**Tabela 8.** Cartas de Sensibilidade aos Antimicrobianos utilizados no VITEK II Compact pelo CoimbraLab.

---

**AST - 359:** Carta utilizada para Enterobacterias e outros Gram negativos

---

**AST - 354:** Carta utilizada para *Pseudomonas spp.*

---

**AST - 586:** Carta utilizada para *Streptococcus spp.*

---

**AST - 648:** Carta utilizada para *Staphylococcus spp.*

---

## 6.7. Serologia Infeciosa

### 6.7.1. Venereal Disease Research Laboratory (VDRL)

A sífilis é uma infecção sexualmente transmissível provocada pelo *Treponema pallidum*. A morbidade e a mortalidade são elevadas.

Habitualmente utiliza-se uma prova serológica não treponémica do tipo Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) como primeiro teste diagnóstico. Trata-se de uma prova de microaglutinação não treponémica, sendo um teste qualitativo, que utiliza como antígeno uma solução de cardiopina, lecitina e colesterol.

A VDRL torna-se, em geral, reativa 4 a 6 semanas após a infecção ou 1 a 3 semanas após o aparecimento da lesão primária. Se a VDRL for reativa, a prova deverá ser quantificada (titulação de reaginas) e confirmada por uma prova serológica treponémica como por exemplo a prova de absorção dos anticorpos treponémicos fluorescentes (FTA-ABS).<sup>42</sup>

### 6.7.2. Wright

O teste Wright é um teste de aglutinação lenta para a deteção dos anticorpos do tipo IgM (fase aguda da doença) com reação contra *Brucella spp.* A brucelose é uma zoonose é causada por bactérias do género *Brucella* e surgem sintomas como febre alta, dor de cabeça e dores musculares. A bactéria é transmitida de animais para o homem através da ingestão de carne mal cozinhada ou alimentos lácteos não pasteurizados, da inalação da bactéria ou pelo contato direto com o animal infetado.<sup>43</sup>

Os anticorpos pesquisados surgem estas por volta do 10º dia da doença, tendo um pico máximo entre as 3 a 4 semanas, atenuando-se depois por volta dos 6 a 7 meses, razão porque pode ser negativa, nos casos de infecção crónica. Considera-se positiva com um título de  $\geq 1/160$ .<sup>44</sup>

### 6.7.3. Reação de Rosa Bengala

A reação de Rosa Bengala é muito utilizada para rastreio, devido à sua sensibilidade e especificidade. A reação de Rosa Bengala tem por base um teste de aglutinação rápido para a deteção dos anticorpos do tipo IgM e IgG com reação contra *Brucella spp.*

Neste teste utiliza-se um antígeno tamponado, corado pelo Rosa Bengala, que deteta, precocemente, aglutininas específicas de *Brucella spp.*, embora um pouco mais tardiamente que a reação de Wright. Habitualmente a reação é negativa até ao final da

primeira semana e, em alguns casos, até ao final da segunda semana, permanecendo depois positiva durante um longo período de tempo.<sup>44</sup>

#### **6.7.4. Reação de Widal**

A reação de Widal é utilizada para detecção de anticorpos no decurso da febre tifóide. Utilizam-se antigénios típicos (O e H) e paratípicos (A e B) que permitem pôr em evidência no soro as aglutininas O (mais precoces) que surgem pelo 8º dia e as aglutininas H pelo 10º - 12º dia. No período de doença aumentam tanto as aglutininas O como as H, declinando as primeiras mais rapidamente que as últimas.

Trata-se de uma aglutinação que é considerada positiva com um título  $\geq 1/160$ .<sup>44</sup>

#### **6.7.5. Reação de Weil-Félix**

A reação de Weil-Felix baseia-se no fato das riquetsias possuírem um componente antigénico idêntico ao antigénio de superfície das estirpes OX - 2, OX - 19 e OX - K de *Proteus vulgaris*; por essa razão trata-se de uma reação pouco específica, podendo ocorrer falsos positivos quando está presente infeção por *Proteus vulgaris*. É uma reação tardia, sendo os anticorpos detetados só no final da segunda semana de doença em que o título mínimo aceitável é  $\geq 1/160$ .<sup>44</sup>

#### **6.7.6. Reação de Paul Bunnell**

A reação de Paul Bunnell é realizada para diagnóstico da mononucleose infecciosa. Durante a infeção pelo vírus Epstein-Barr (EBV) são produzidos anticorpos que são pesquisados neste teste. Os anticorpos detetados podem ser causados por outras condições que não a mononucleose infecciosa, sendo portanto, um teste pouco específico.<sup>44</sup>

#### **6.7.7. Marcadores virais**

O diagnóstico viral foi realizado no CoimbraLab através da detecção de anticorpos no soro com recurso ao equipamento Architect i2000 SR (Anexo II).

Os anticorpos que foram pesquisados durante o estágio foram anti-Citomegalovírus, anti-Hepatite C, anti-HIV, anti-Hepatite A e anti - vírus da Rubéola.

## **7. Avaliação externa de qualidade**

A necessidade de transmitir informação correta, assim como de obter resultados fiáveis e comparáveis enfatizam a importância da Garantia da Qualidade. A participação em processos de Avaliação Externa da Qualidade constitui uma ferramenta imprescindível no âmbito do Controlo de Qualidade analítica implementado no laboratório.

Os dois laboratórios em que realizei estágio participam em programas de Avaliação Externa de Qualidade em todas as áreas das Análises Clínicas: Hematologia, Bioquímica, Imunologia e Microbiologia.

O LAC-FFUC e o CoimbraLab participam num programa desenvolvido pelo Instituto Ricardo Jorge (PNAEQ). Paralelamente o CoimbraLab participa também Avaliação Externa da Sociedade Espanhola de Química Clínica (SEQC).

O programa conta com a colaboração de peritos nacionais e internacionais, que selecionam amostras controlo e casos-estudo. No laboratório estas amostras são processadas em conjunto com as amostras dos utentes e os resultados são enviados para serem avaliados. As entidades responsáveis pelos programas elaboram relatórios que incluem pareceres técnicos/científicos de peritos que são enviados ao laboratório.

## **8. Fase pós-analítica**

A validação dos resultados compreende a validação analítica e a validação biopatológica.

A validação analítica é realizada pelos técnicos que executaram a análise sobre supervisão de um especialista e é feita segundo procedimentos escritos (tendo em conta o histórico do utente e dados clínicos relevantes) e tendo em conta o bom funcionamento dos instrumentos e o conhecimento dos resultados do controlo da qualidade interno.

A validação biopatológica é da competência exclusiva do especialista que assegura, sempre que possível, a compatibilidade dos resultados no mesmo doente, ao longo do tempo, e tem em atenção as variações no seu estado clínico e a terapêutica efetuada. A ficha do utente constitui um dado fundamental para a correta interpretação dos seus dados e estudo posterior.

## 9. Conclusões

O estágio que realizei no LAC-FFUC no CoimbraLab foi crucial na aquisição de novos conhecimentos e no aprofundar de outros que foram adquiridos durante o MAC.

A elevada automatização está presente em todas as áreas, mas é sem dúvida, crucial para disponibilizar os resultados laboratoriais ao utente em tempo útil e permite reduzir os erros laboratoriais

No período em que decorreu o estágio tive a oportunidade de contactar com vários produtos biológicos e acompanhar o seu percurso laboratorial desde a triagem até à validação biopatológica e emissão dos resultados. A interpretação dos resultados de exames laboratoriais é muito mais complexa que a simples comparação com os valores de referência, requer a avaliação do processo geral do doente, incluindo o histórico e algumas características do seu estado de saúde. O controlo de qualidade interno (C.Q.I.) e a avaliação externa da qualidade (A.E.Q.) são essenciais para o bom funcionamento de um laboratório de análises clínicas.

A realização deste estágio permitiu-me assim adquirir uma visão global e compreender a aplicabilidade clínica de um laboratório de análises clínicas. Considero que os objetivos propostos para o estágio foram atingidos, nomeadamente a aplicação dos conhecimentos adquiridos num contexto de trabalho, a integração no meio profissional e o contato com os outros profissionais de saúde. Sem dúvida que foi um privilégio partilhar este tempo com profissionais qualificados sempre disponíveis para clarificar as dúvidas que iam surgindo.

O estágio foi, sem dúvida, uma experiência enriquecedora que, contribuiu para fazer de mim uma melhor profissional de saúde, no futuro.



## 10. Bibliografia

1. BANFI, G.; DOLCI, A. - **Preanalytical phase of sport biochemistry and haematology.** Journal of Sports Medicine and Physical Fitness. Vol.43, nº2 (2003),p. 223–230.
2. NP EN ISO 15189 (2007). - **Laboratórios Clínicos - Requisitos particulares para a qualidade e competência.** Instituto Português da Qualidade, Lisboa
3. PORTUGAL. Direção-Geral da Saúde - **Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos.** Lisboa: DGS, 2015.
4. World Health Organization. WHO - **Guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy,** 2010.
5. SILVA, João; BEATO, Sílvia; RODRIGUES, Francisco - **Anticoagulantes & Tubos de colheita.** Castelo Branco: Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias. [Consultado a 22-02-2018]. Disponível em: <https://repositorio.ipcb.pt/bitstream/10400.11/626/1/Poster%20Anticoagulantes%20joao%20Silva%5BI%5D.pdf>
6. CARRARO, Paolo; PLEBANI, Mario - **Errors in a stat laboratory: Types and frequencies 10 years later.** Clinical Chemistry. Vol. 53, nº7 (2007), p. 1338–1342. [Consultado a 23-02-2018]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17525103>
7. LIPPI, Giuseppe *et al.* - **Preanalytic error tracking in a Laboratory Medicine Department: Results of a 1-year experience.** Clinical Chemistry. Vol.52, nº7 (2006), p. 1442-1443. [Consultado a 23-02-2018]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16798977>
8. WALLIN, Olof *et al.* - **Preanalytical venous blood sampling practices demand improvement - A survey of test-request management, test-tube labelling and information search procedures.** Clinica Chimica Acta. Vol. 391, nº1-2 (2008), p. 91–97. [Consultado a 23-02-2018]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898108001034>
9. TERRA, Paulo. - **Coagulação: interpretação clínica dos testes laboratoriais de rotina.** 2ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2001. ISBN 8573792795
10. BECKMAN COULTER, Inc. - **Technology and case studies-DXH 500 Hematology series,** 2018. [Consultado a 24-01-2018]. Disponível em: <https://www.beckmancoulter.com/en/products/hematology/dxh-500>
11. COULTER, W. H. - **High speed automatic blood cell counter and size analyzer.** In: National Electronics Conference, Chicago, 1956.
12. PORTUGAL. Direção-Geral da Saúde - **Prescrição e determinação do hemograma.** Lisboa: DGS, 2013.

13. UTHMAN, Ed - **Understanding anemia**. The Nurse practitioner. 1ª Ed. University Press of Mississippi , 1998. ISBN 1-57806-038-9
14. HOFFBRAND, A. Victor; MOSS, Paul A.H. - **Fundamentos em Hematologia de Hoffbrand**. 7ª Ed, Artmed, 2018. ISBN 9788582714508
15. BAIN, Barbara J. *et al.* - **Dacie and Lewis practical haematology**. 11ª Ed., Elsevier Churchill Livingstone, 2012. ISBN 9780702069253.
16. PIVA, Elisa *et al.* - **Clinical Utility of Reticulocyte Parameters**. Clinics in Laboratory Medicine, Vol.35, nº1 (2015) p. 133–163.
17. TURGEON, Mary Louise - **Clinical Hematology: Theory and Procedures**. 4ª Ed. Philadelphia, Lippincott Williams &Wilkins, 2005. ISBN 0-7817-5007-5
18. BARBARA J. BAIN - **Células Sanguíneas – Um guia prático**. 5ª Ed, Porto Alegre: Artmed Editora, 2016. ISBN 9788582713310
19. SMOCK, K. J.; PERKINS, S. L. - **Thrombocytopenia: An update**. International Journal of Laboratory Hematology. Vol.36, nº3 (2014), p. 269–278.
20. MORAIS, Marcio Cruvinel - **Laboratório Clínico: Teoria e Prática**. 1ª Ed. Rio Verde, 2013. ISBN 9788580454512
21. THEML, Harald.;DIEM,Heinz.;HAFERLACH,Torsten - **Color Atlas of Hematology: Practical Microscopic and Clinicaal Diagnosis**. 2ªEd, New York: Thieme ,2004. ISBN 1-58890-193-9
22. RODAK, Bernadette. F. - Hematology: **Clinical Principles and Applications**. 2ª Ed, Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2002. ISBN 9789500618762.
23. HOFFBRAND, A. Victor; MOSS, Paul A.H.; PETIT, J.E. - **Fundamentos em Hematologia**. 5ªEd, Artmed Editora, 2009. ISBN 8536314532
24. COELHO, Tiago Henriques; MOREIRA, Adelino Leite – **Função Hemostática e sua Avaliação, Texto de Apoio**. Porto:Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 2011. [Consultado a 14-06-2018]. Disponível em: <http://www.uff.br/WebQuest/downloads/Hemostase.pdf>
25. RODGERS, Griffin P.; YOUNG, Neal S - **Manual Bethesda de Hematologia Clínica**. 3ªEd, Rio de Janeiro, Revinter Ltda, 2017. ISBN 978-85-372-0687-4
26. G GREER, John P. *et al.* - **Wintrobe’s clinical hematology**. 13ªEd, Philidelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2014. ISBN 9781451172683
27. FOWLER, A.; PERRY, D. J. - **Laboratory monitoring of haemostasis**. Anaesthesia. Vol.70 nº1 (2015), p.24-72. [Consultado a 12-02-2018]. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/anae.12919>

28. SANTOS, V.M. dos; CUNHA, S.F de C. da; CUNHA, D.F. da - **Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações**. Rev Ass Med Brasil. Vol. 46, nº3 (2000), p. 232–6 [Consultado a 14-06-20 PRATS, Guillem - Microbiología clínica. 1ªEd, Madrid, Editorial Médica Panamericana, S. A., 2008. ISBN 978-84-7903-971-4
30. MURRAY, Patrick; ROSENTHAL, Ken; PFALLER, Michael A - **Microbiologia Médica**. 8ª Ed, Elsevier Editora Ltda., 2017. ISBN 9788535286458
31. GOLAN, David E. et al. - **Principles of Pharmacology. The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy**. 2ª Ed, USA, Lippincott Williams & Wilkins, 2008. ISBN 978-0-7817-8355-2
32. MARTOS, Pedro García; BARRIO, María Teresa Fernández del; SALIDO, Fernando Paredes - **Microbiología clínica aplicada**, 3ª Ed, Espanha, Editora Díaz de Santos, S.A., 1997. ISBN 84-7978-281-1
33. Biomerieux - **chromID™ CPS® Elite e outros meios chromID™ para infeções do trato urinário**. [Consultado a 29-06-2018]. Disponível em <http://www.biomerieux.pt/produto/chromidtm-cpsr-elite-e-outros-meios-chromidtm-para-infeco-es-do-trato-urinario>>
34. MASCOTE, Catarina Samuel - **Novas formas de caracterização do microbioma oral**. Instituto superior de ciências da saúde egas moniz (2017). [Consultado a 29-06-2018]. Disponível em: [https://comum.rcaap.pt/bitstream/10400.26/20211/1/Mascote\\_Catarina\\_Samuel.pdf](https://comum.rcaap.pt/bitstream/10400.26/20211/1/Mascote_Catarina_Samuel.pdf)
35. ZEIBIG, Elizabeth A. - **Parasitologia Clínica: Uma abordagem clínico- laboratorial**, 2ª Ed, Elsevier Editora Ltda, 2014. ISBN 978-85-352-7477-6
36. MURRAY, David - **Microbiologia médica**, 6ª Ed, Elsevier, Inc., 2010. ISBN 978-0-323-05470-6
37. TOBERGTE, David R.; CURTIS, Shirley - **Direção-Geral da Saúde**. Journal of Chemical Information and Modeling. Vol. 53, nº9 (2013), p. 1689–1699 [Consultado a 08-04-2018]. Disponível em: <https://www.dgs.pt/?cr=34221>
38. RODRIGUES DA SILVA, Vanessa *et al.* - **Detecção precoce no meio ChromID MRSA de Staphylococcus aureus resistentes à metilina isolados em Hemoculturas**. [Consultado a 01-07-2018]. Disponível em: [https://repositorio-cientifico.uatlantica.pt/bitstream/10884/608/1/staphylococcus\\_aureus\\_resistentes\\_meticilina.pdf](https://repositorio-cientifico.uatlantica.pt/bitstream/10884/608/1/staphylococcus_aureus_resistentes_meticilina.pdf)
39. U.S.A. Centers for Disease Control and Prevention - **Division of Parasitic Diseases**. Clifton Road Atlanta: CDC, 2018. [Consultado a 22-06-2018]. Disponível em <https://www.cdc.gov/dpdx/az.html>
40. Biomerieux - **VITEK® 2 COMPACT Instrument**, USA, 2018. [Consultado a 8-04-2018]. Disponível em: <https://biomerieuxdirect.com/industry/Bacteriology/ID-AST-Auto/Automated-%3A-VITEK-system/VITEK-2-Compact-Equipment/VITEK-2-Compact-Instrument-Sales-New/VITEK%26reg-2-COMPACT/p/27630>

41. PORTUGAL. Direção-Geral da Saúde - **Diagnóstico e Tratamento da Amigdalite Aguda na Idade Pediátrica**. Lisboa:DGS, 2013
42. PORTUGAL. Direção-Geral da Saúde - **Saúde Reprodutiva - Doenças Infecciosas e Gravidez. Orientações Técnicas**. Lisboa: DGS, 2000.
43. PESSEGUEIRO, Pedro *et al.* - **Brucellosis – a systematic revision**. 91 Medicina Interna, Vol 10, nº2 (2003). [Consultado a 04-07-2018]. Disponível em: <https://www.spmi.pt/revista/vol10/vol10-n2-brucelose.pdf>
44. V VALENTE, Cristina *et al.* - **Diagnóstico serológico de algumas doenças infecciosas**.Vol.6 (1993), p. 605–612. [Consultado a 05-06-2018]. Disponível em: <https://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/viewFile/3165/2504>

**Anexo I. Equipamentos utilizados no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra**

<u>Área</u>	<u>Equipamento</u>	<u>Observações</u>
<u>Hematologia</u>	Coulter HMX Hematology Analyzer 	Hemograma
	OPTION 4 Plus da Biomérieux 	Coagulação
<u>Bioquímica</u>	SAS-1 e SAS-2 da Helena – BioSciences Europe 	Proteinograma
	Combi scan 100 – Analyticon 	Urina tipo II
	SPOTLYTE Na/K/Cl ANALYZER 	Ionograma
	Beckman Olympus AU400 	Bioquímica
<u>Imunologia</u>	VIDAS 30 da Biomérieux 	Imunologia



## Anexo II. Equipamentos utilizados no CoimbraLab

<u>Área</u>	<u>Equipamento</u>	<u>Observações</u>
<u>Hematologia</u>	Pentra 80 	Hemograma
	Thrombolyser XR 	Coagulação
	VesMatic 	Velocidade de sedimentação
<u>Bioquímica</u>	Beckman Olympus AU680 	Bioquímica
	Microtech – 648 ISO 	Proteinograma
	Aution Max 	Urina tipo II

---

Arkray Adams Alc HA-8160

**Bioquímica**



Hemoglobina glicada

---

Architect i2000 SR

**Imunologia**

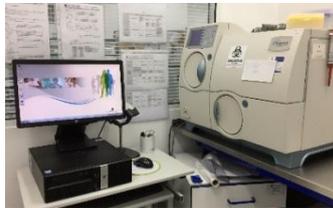


Imunologia

---

Vitek II Compact

**Microbiologia**



Identificação bacteriana e suscetibilidade a antibióticos

### Anexo III. Valores de referência do hemograma utilizados no LAC-FFUC

<u>Parâmetros</u>		<u>Valores de referência</u>
Eritrócitos	Homens Mulheres	4,5 – 5,9 × 10 <sup>12</sup> /L 4,1 – 5,1 × 10 <sup>12</sup> /L
Hemoglobina	Homens Mulheres	140 – 175 g/L 120 – 153 g/L
Hematócrito	Homens Mulheres	0,42 – 0,50 L/L 0,36 – 0,45 L/L
VCM	Adultos	80 – 96 fL
HCM	Adultos	27 – 33 pg
CHCM	Adultos	300 – 350 g/L
RDW	Adultos	11,6 – 14 %
Leucócitos	Adultos	4,0 – 11,0 × 10 <sup>9</sup> /L
	Adultos	# %
Neutrófilos		2,7 – 7,0 × 10 <sup>9</sup> /L (40 – 80 %)
Linfócitos		1,0 – 3,0 × 10 <sup>9</sup> /L (20 – 40 %)
Monócitos		0,2 – 1,0 × 10 <sup>9</sup> /L (2 – 10 %)
Eosinófilos		0,02 – 0,5 × 10 <sup>9</sup> /L (1 – 6 %)
Basófilos		0,02– 0,1 × 10 <sup>9</sup> /L (<1 %)
Plaquetas	Adultos	150 – 400 × 10 <sup>9</sup> /L



**Anexo IV – Lista de antibióticos utilizados para validação dos antibiogramas no CoimbraLab**

Carta N359 – Gram negativos	Carta N354 – <i>Pseudomonas spp.</i>
Ampicilina Amoxicilina/Ácido clavulânico Cefuroxima axetil * Cefotaxima Ciprofloxacina Fosfomicina ** Nitrofurantuína*** Trimetoprim / Sulfametoxazol	Ticarcilina Piperacilina / Tazobactam Ciprofloxacina Levofloxacina Trimetoprim / Sulfametoxazol
Carta P586 – <i>Streptococcus spp.</i>	Carta P648 – <i>Staphylococcus spp.</i>
Ampicilina Ampicilina / Sulfabactam Levofloxacina Eritromicina Trimetoprim / Sulfametoxazol Nitrofurantuína***	Penicilina Oxacilina Levofloxacina Eritromicina Nitrofurantuína*** Trimetoprim / Sulfametoxazol

\*Se criança substituir Cefuroxima Axetil por Cefuroxima Sódio

\*\*Usar unicamente em infeções urinárias provocadas por *E.coli*

\*\*\* Usar unicamente em infeções urinárias