



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

João Pedro Nunes Queiroz

## Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Teresa Carmo Pimenta Dinis Silva e pelo Dr. Paulo João Soares da Silva e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2019



João Pedro Nunes Queiroz

Relatório de estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas,  
orientado pela Professora Doutora Teresa Carmo Pimenta Dinis Silva  
e pelo Dr. Paulo João Soares da Silva e apresentado a Faculdade  
de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2019



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA



“...we can't understand everything at once, we can't  
Start right out with perfection. To achieve perfection,  
one must first begin by not understanding many  
things! And if we understand too quickly, we may not  
understand well.”

Fiódor Dostoiévski – The idiot (1869)



# Agradecimentos

---

*Aos meus pais, por sempre me acompanharem e me terem transmitidos os valores que fazem de mim a pessoa que hoje sou.*

*À minha irmã por toda a paciência e auxílio prestado ao longo deste trabalho.*

*Aos meus colegas que levo comigo para a vida e dos quais nunca me esquecerei.*

*A toda a equipa do Laboratório São José pela simpatia, perseverança e conhecimento adquirido, em especial ao Dr. Paulo João Soares e a Dr. Carla Almeida pelo auxílio prestado na elaboração deste relatório.*

*À Professora Doutora Teresa Carmo Pimenta Dinis Silva pela orientação, disponibilidade e conhecimentos transmitidos.*



# Índice

## Relatório de Estágio Análises Clínicas

LISTA DE ABREVIATURAS .....	7
RESUMO .....	9
ABSTRACT .....	10
INTRODUÇÃO .....	11
CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO .....	12
CONTROLO DE QUALIDADE .....	13
HEMATOLOGIA .....	15
HEMOGRAMA .....	15
RBC .....	18
WBC .....	18
PLT .....	18
HB .....	18
HCT .....	18
PCT .....	18
MCV .....	18
MPV .....	18
MCH .....	18
MCHC .....	18
RDW .....	19
PDW .....	19
RETICULÓCITOS .....	19
ESFREGAÇO DE SANGUE PERIFÉRICO .....	19
VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO .....	20
COAGULAÇÃO .....	20
TEMPO DE PROTROMBINA .....	21
TEMPO PARCIAL DE TROMBOPLASTINA ATIVADA .....	22
FIBRINOGENIO .....	22
D-DÍMEROS .....	23
ANTICOAGULANTE LÚPICO .....	23

MICROBIOLOGIA.....	25
TRANSPORTE DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS APÓS PROCESSAMENTO .....	25
URINA .....	25
FEZES.....	28
EXSUDADOS GENITAIS .....	29
EXSUDADOS NASAIS .....	32
EXSUDADOS FARÍNGEOS .....	32
LÍQUIDOS SEROSOS .....	33
SANGUE .....	34
EXPECTORAÇÃO .....	39
CONCLUSÃO .....	41
BIBLIOGRAFIA.....	43

## Lista de Abreviaturas

---

CFU – *Colony-forming units*

CNA – Colistina e Ácido nalidíxico

Hb – Hemoglobina

PLT – *Platelet*

PVS – Polivitamin Supplement

RBC – *red blood cells*

SPS – *Sodium polyanetholesulfonate*

TSA – Teste de sensibilidade aos antibióticos

UFC – Unidade formadora de colónias

UTI – *Urinary tract infection*

VCAT – Vancomicina, colimicina, anfotericina e trimetoprim

VS – Velocidade de sedimentação

WBC – *white blood cell*



## Resumo

---

O presente relatório tem como objetivo apresentar uma reflexão de parte do conhecimento adquirido e consolidado durante o estágio curricular, integrado no Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, realizado no Laboratório São José.

Mais do que uma mera descrição dos procedimentos e técnicas essenciais à área das análises clínicas, este relatório pretende enaltecer esta especialidade como uma ferramenta essencial, e ao mesmo tempo complementar ao diagnóstico, valorizando acima de tudo o diálogo entre o laboratório e o clínico como um instrumento essencial na contextualização e subsequente valorização dos resultados apresentados.

A tecnologia poderá e irá avançar cada vez mais permitindo resultados mais sensíveis e específicos, mas o papel do especialista continuará a ser determinante para a correta contextualização e valorização dos resultados.

**Palavras-chave:** Análises Clínicas; Microbiologia; Hematologia; Hemocultura; Urocultura.

# Abstract

---

This report aims to present a reflection of part of the knowledge acquired and consolidated during the curricular internship, integrated in the Master of Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra, held in the São José Laboratory.

More than a mere description of the essential procedures and techniques in the area of laboratory medicine, this report aims to praise clinical pathology as an essential and complementary tool to diagnosis, valuing above all the dialogue between the laboratory and the physician as an essential tool in the contextualization and subsequent valorisation of the results.

Technology can and will advance further allowing more sensitive and specific results, but the role of the pathologist will continue to be crucial for the correct contextualization and valuation of the results.

**Keywords:** Clinical Pathology; Microbiology; Haemathology; Blood Culture; Uroculture.

## Introdução

---

O presente relatório visa descrever as atividades desenvolvidas durante o decorrer do estágio curricular integrado no mestrado de análises clínicas.

O estágio é apoiado por profissionais da área do diagnóstico laboratorial, geralmente, especialistas em Análises Clínicas ou em Patologia Clínica e engloba as quatro áreas principais do diagnóstico clínico-laboratorial, Bioquímica, Microbiologia, Hematologia e Imunologia. Sendo que neste relatório em concreto apenas serão abordadas as áreas da Hematologia e Microbiologia.

Ao longo do relatório será abordada a organização do laboratório e será feita uma descrição dos sectores abordados, contemplando as atividades neles desenvolvidas.

# CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO

---

O presente relatório pretende descrever o estágio realizado no Laboratório S. José no período de janeiro a junho de 2019, sob a orientação do Dr. Paulo João Soares, Diretor Técnico do laboratório, incluindo os setores da Bioquímica, Hematologia, Imunologia e Microbiologia. Foram escolhidas as valências de hematologia e microbiologia para abordar com maior ênfase neste relatório (Figura 1).

O Laboratório S. José é dirigido pelo Dr. Paulo João Soares, especialista em Análises Clínicas pela Ordem dos Farmacêuticos. O quadro técnico do laboratório é constituído por farmacêuticos, bioquímicos, técnicos de análises, pessoal administrativo e auxiliares. O Laboratório é composto por oito unidades de atendimento. O laboratório central, localizado no Hospital da Luz – Coimbra, funciona de uma maneira completamente independente e autónoma, sendo o único responsável pela valência de Análises Clínicas; 3 outras unidades em Coimbra (R. Combatentes, CLIMAG e Pedrulha) e 4 no exterior da cidade de Coimbra (Ceira, Semide, Miranda do Corvo e Louriçal).

O Serviço conta em média com cerca de 200 utentes por dia, sendo que estes em primeiro lugar são atendidos e registados no sistema, sendo-lhes atribuído um número de utente único, o que torna possível um fácil acesso a todos os tipos de análises e histórico do utente. O doente é encaminhado para as salas de colheitas e as amostras (sangue, urina, fezes, ...) serão posteriormente transferidas para o laboratório central e uma vez lá distribuídas/ processadas nos diferentes sectores consoante as análises requisitadas.

Todo o processo analítico é suportado por avançados sistemas de controlo de qualidade interna e avaliações externas da qualidade, permitindo uma constante qualidade dos resultados.



**Figura 1:** Laboratório S. José, sala onde são realizadas as determinações referentes aos sectores de bioquímica e hematologia

# CONTROLO DE QUALIDADE

---

O controlo de qualidade tem como objetivo garantir a máxima qualidade, reprodutibilidade e eficácia das análises clínicas realizadas, permitindo desta maneira a transmissão de informação o mais fiável possível e resultando em melhores diagnósticos e terapêuticas mais adaptadas à situação do utente.

Assim o controlo de qualidade tem de estar presente nas três fases analíticas, pré-analítica, analítica e pós-analítica. A fase pré-analítica inclui os eventos anteriores ao processamento da amostra, a fase analítica inclui o processamento propriamente dito e a pós analítica assenta na validação e interpretação dos resultados de modo a que possam ser fornecidos aos clínicos/utentes.

Apesar disto, verifica-se através de diferentes estudos que a distribuição dos erros ocorre em maior proporção nas fases extra analítica, ou seja, nas fases pré e pós-analíticas, em particular na fase pré-analítica, o que pode constituir até 70% de todos os erros do diagnóstico laboratorial.<sup>1</sup> A quantidade de erros na fase analítica tem vindo a diminuir devido a um melhor controlo do processo proporcionado pelos avanços na automatização, programas informáticos e implementação de programas de avaliação de qualidade. Por outro lado, os erros na fase pré-analítica dependem por vezes de fatores externos ao laboratório e por isso são mais difíceis de controlar; para além disso envolvem diversos profissionais e várias etapas sendo mais complicado controlar as diversas variáveis nesta fase. Os erros nesta fase podem ser caracterizados como extra-laboratório em que os procedimentos não se realizam no laboratório clínico nem no controlo deste ou como intra-laboratório em que o contrário sucedeu.

Os erros mais comuns estão associados à qualidade da amostra recebida no laboratório, hemolisada, insuficiente ou coagulada, ou ao transporte da mesma (demasiado tempo no transporte, exposição à luz e a temperaturas inadequadas). No caso de um laboratório hospitalar estes erros são extra-laboratório.

Os erros intra-laboratório incluem o registo administrativo das amostras, podendo haver uma identificação incorreta ou insuficiente do utente e/ou da preparação da amostra para análise que engloba o tempo de espera desde a colheita até à sua manipulação, centrifugação e distribuição pelas diferentes valências.<sup>1</sup>

No controlo de qualidade interno são analisados os diferentes parâmetros, segundo um plano de controlo de qualidade pré-estabelecido. Este procedimento é realizado de

manhã antes do serviço iniciar. Os parâmetros são calibrados sempre que o controlo sai fora dos limites aceitáveis quando ocorre mudança de lote dos reagentes. É analisada a variação de cada parâmetro (gráficos de Levey-Jennings) e interpretadas de acordo com as regras de *Westgard*, sendo analisados os controlos externos das diferentes técnicas, em simultâneo.

O controlo de qualidade externo permite aferir a exatidão dos resultados do próprio laboratório. Os controlos são enviados pela entidade avaliadora e processados como se fossem amostras de rotina, depois de obtidos os resultados, estes são enviados de volta para a respetiva entidade avaliadora onde é comparado o valor obtido com o valor real determinado pela entidade.

# Hematologia

---

Neste sector são determinados os parâmetros referentes ao hemograma, reticulócitos, velocidade de sedimentação e coagulação, pelo que serão abordadas as determinações e os aparelhos utilizados nesta valência.

Neste sector trabalha-se com sangue total, recolhido para tubos com EDTA de modo a evitar a coagulação. Na coagulação trabalha-se com plasma citratado como amostra.

## Hemograma

O hemograma é uma das análises mais solicitadas e torna possível o estudo da morfologia das células e a sua contagem, para além da quantificação de hemoglobina. Esta análise é realizada no analisador de diagnóstico automatizado *Cell Dyn 3700*<sup>®</sup> que tem capacidade para determinar 17 parâmetros simultaneamente incluindo os que constituem o hemograma propriamente dito (eritrócitos, leucócitos, hemoglobina, plaquetas) e a determinação de reticulócitos quando necessário.<sup>2</sup> Este analisador trabalha segundo dois princípios, a impedância elétrica (princípio de Coulter) e a dispersão da luz laser (difração/*scattering* da luz), sendo o primeiro usado para contagem de células (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) e o segundo para contagem e diferenciação de leucócitos (Figura 2).<sup>2</sup>

O princípio de Coulter estabelece que a passagem de células através de uma abertura num líquido condutor irá provocar um aumento da resistência elétrica (diminuindo a condutividade) do líquido; esse aumento por sua vez é proporcional ao volume da partícula e o número de impulsos correspondente ao número de partículas/células.<sup>3</sup>

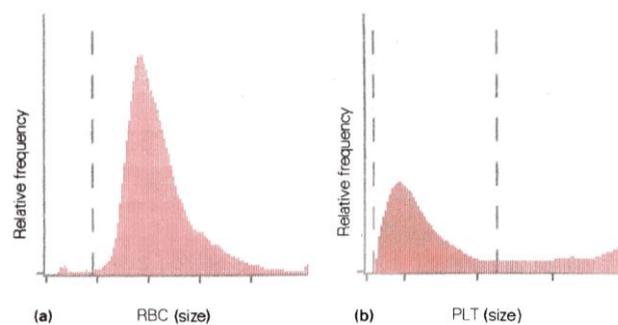
Neste equipamento há 4 determinações independentes: contagem e diferenciação de leucócitos realizada por difração da luz, contagem de leucócitos através do princípio da impedância elétrica no canal de impedância, contagem de eritrócitos e plaquetas efetuadas num canal independente e determinação da hemoglobina por espectrofotometria. Leucócitos (WBC), eritrócitos (RBC), hemoglobina (HGB) e plaquetas (PLT) são medidos diretamente, mas outros parâmetros (hematócrito, hemoglobina globular média, concentração de hemoglobina corpuscular média) são calculados automaticamente a partir dos dados fornecidos pelas determinações anteriores. A hemoglobina é medida por espectrofotometria a 540nm através do método de cianometehemoglobina, no qual, os eritrócitos são lisados para ocorrer libertação da Hb, em seguida o ferro no grupo heme é oxidado passando do estado ferroso para o férrico e em conjunto com o cianeto presente

no reagente leva à formação de um complexo que é lido a 540nm, sendo a absorvância proporcional à concentração de hemoglobina na amostra.<sup>2, 4</sup>

A contagem e diferenciação em cinco populações leucocitárias por sua vez é feita através da lise dos eritrócitos com reagentes hemolisantes e a separação dos leucócitos é feita de acordo com o seu tamanho e complexidade celular. Este processo denominado por leucograma permite a determinação do número de leucócitos seguida pela diferenciação dos vários tipos de leucócitos (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos) (Figura 4).

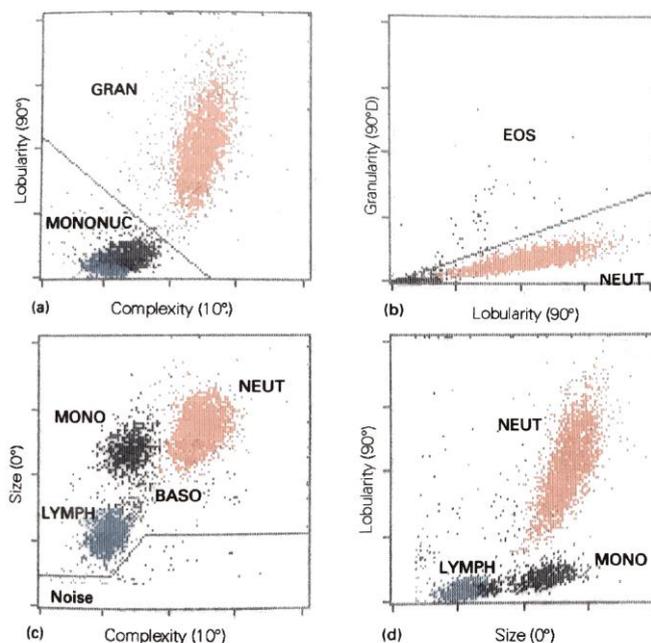


**Figura 2:** *Cell Dyn 3700*<sup>®</sup>.



**Figura 3:** Histogramas de distribuição de volume dos eritrócitos e plaquetas.

(Retirado da referência 4)



**Figura 4:** Gráficos de dispersão da população leucocitária. (Retirado da referência 4)

A dispersão da luz a  $0^\circ$  fornece informações acerca do tamanho celular, dispersão da luz a  $10^\circ$  fornece informações acerca da complexidade celular, dispersão da luz a  $90^\circ$  fornece informações acerca da lobularidade.

A identificação de células com características irregulares na circulação sanguínea permite emitir “alarmes” para blastos, linfócitos atípicos, eritroblastos e granulócitos imaturos.

A determinação de leucócitos por duas tecnologias serve como mecanismo interno de controle de qualidade. A contagem leucocitária no canal de impedância (WIC) é falsamente elevada quando existem eritrócitos nucleados, enquanto a contagem leucocitária no canal óptico (WOC) exclui esses eritrócitos através da análise da dispersão da luz laser, contudo como o canal óptico emprega um agente lítico menos potente, o valor pode ser falsamente elevado quando houver eritrócitos osmoticamente resistentes, como acontece em algumas amostras de sangue neonatal.

Os reticulócitos são formas imaturas eritrocitárias que ainda possuem algum RNA. Esse RNA é submetido a coloração supra-vital com azul de metileno que causa a sua precipitação e são detectados de seguida por difração/*scattering* da luz.<sup>4</sup>

## Parâmetros

**Contagem do número total de eritrócitos (RBC):** consiste na contagem do número de eritrócitos por unidade de volume. Este parâmetro não deve ser usado para chegar a um possível diagnóstico de anemia visto que existem casos de anemia com valores elevados de glóbulos vermelhos como as talassemias e outros casos em que o número de eritrócitos é baixo sem ser indicativo de anemia.

**Contagem do número total de leucócitos (WBC):** consiste na contagem do número de leucócitos por unidade de volume. Leucocitoses estão normalmente associadas a infecções bacterianas e inflamações.

**Contagem do número total de Plaquetas (PLT):** consiste em definir o número de plaquetas por unidade de volume.

**Hemoglobina (Hb):** a determinação da hemoglobina é por sua vez o parâmetro que deve ser usado para o diagnóstico da anemia. Esta determinação varia principalmente com o sexo, idade e altitude em que se encontra o utente.

**Hematócrito (Hct):** É a proporção entre o volume ocupado pelos eritrócitos e o volume total de sangue.

**Plaquetócrito (PCT):** É a proporção entre o volume ocupado pelas plaquetas e o volume total de sangue.

**Volume Globular Médio (MCV):** Traduz o volume médio dos glóbulos vermelhos, permitindo assim analisar variações no tamanho dos mesmos e categorizar a população eritrocitária em normocítica, macrocítica ou microcítica.

**Volume Plaquetar Médio (MPV):** Traduz o volume médio das plaquetas e pode estar associado a trombocitose, trombocitopenia ou a uma contagem de plaquetas dentro dos valores padrão.

**Hemoglobina Globular Média (MCH):** Indica a quantidade média de hemoglobina por eritrócito.

$$\text{MCH (pg)} = \frac{\text{Hb (g/dl)} \times 10}{\text{RBC (células/L)} \times 10^{-12}}$$

**Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (MCHC):** É definida pela quantidade de hemoglobina existente no volume ocupado pelos glóbulos vermelhos em vez daquele ocupado pela totalidade do sangue, daí dividir-se a concentração de Hb pelo Hct.

Este é o parâmetro que deve ser utilizado para analisar a quantidade de Hb por eritrócito e categorizá-los em hipocrômicos, normocrômicos ou hiperocrômicos

$$\text{MCHC (g/dl)} = \frac{\text{Hb (g/dl)}}{\text{Hct}}$$

**Amplitude de distribuição eritrocitária (RDW):** É usado como um índice de anisocitose, pelo que reflete a variação de volume numa determinada população eritrocitária, sendo que quanto maior for a severidade da anisocitose mais elevado será o RDW. Analisado em paralelo com o histograma sendo que por norma devem ser concordantes um com o outro. Um histograma ilustra a variação em volume e no tamanho das células de forma gráfica, com dois eixos X e Y, no qual o X traduz o tamanho/volume das células e o Y o número delas (Figura 3).

**Amplitude de distribuição plaquetar (PDW):** Semelhante ao RDW diferindo no facto que reflete a variação volumétrica numa determinada população plaquetar em vez de eritrocitária.<sup>4, 5</sup>

## Reticulócitos

Os reticulócitos são formas imaturas eritrocitárias que ainda possuem algum RNA. A sua medida é importante para avaliar a resposta da medula, por exemplo em casos de anemia hemolítica, um valor alto demonstra um mecanismo compensatório por parte da medula que é o que é fisiologicamente normal. Por sua vez um valor baixo de reticulócitos concomitante com um baixo valor de eritrócitos indica uma ausência de resposta/uma supressão da medula óssea, visto que não há um aumento dos reticulócitos para compensar a perda de eritrócitos.

## Esfregaço de Sangue Periférico

O esfregaço de sangue periférico é usado para investigar/confirmar anormalidades no hemograma, tais como agregados plaquetares, trombocitopenias, impossibilidade do cálculo da fórmula leucocitária pelo autoanalisador, monocitose entre outras, e não como análise de rotina. Desta maneira é possível confirmar os resultados do hemograma fornecidos pelo autoanalisador e analisar a morfologia das diferentes células conseguindo verificar situações de poiquilocitose, anisocitose, presença de formas atípicas ou imaturas, sombras nucleares, hipersegmentação entre outras.<sup>4</sup> Estes esfregaços são corados pela técnica de May-Grünwald–Giemsa.<sup>4</sup>

## Velocidade de sedimentação

A velocidade de sedimentação é a medida em milímetros da deposição dos eritrócitos por hora num tubo de vidro montado verticalmente num apoio.<sup>6</sup>

Esta sedimentação progressiva ocorre, pois, os eritrócitos têm uma carga negativa pelo que quando se juntam e formam aglomerados repelem-se mutuamente contrariando a força gravítica e diminuindo a velocidade a que se depositam. Fatores como o aumento de proteínas de fase aguda, viscosidade do plasma, o rácio entre RBC e plasma e o fenómeno de rouleaux alteram este equilíbrio de forças aumentando a VS.

O método consiste em colocar sangue venoso anticoagulado com citrato de sódio a 3,8% (relação 4:1). O teste deve ser realizado à temperatura ambiente pois o aumento da temperatura leva ao aumento da sedimentação.

Os valores da VS são influenciados pela resposta inflamatória que inclui alterações séricas de diversas proteínas, como aumentos no fibrinogénio, haptoglobina, ceruloplasmina, imunoglobulinas (Ig) e da Proteína C reativa (CRP) e diminuições na albumina. Por isso, a VS é utilizada como um indicador sensível da presença de inflamação e lesão tecidual, embora seja inespecífico. Por vezes determina-se também a CRP em conjunto com a VS visto que esta é um marcador sensível de inflamação.

A determinação da VS também pode ser feita por métodos automatizados. Neste caso a determinação é feita normalmente por fotometria cinética capilar onde sensores infravermelhos irão detetar alterações na densidade ótica do sangue, que depois são convertidas em mm através de um algoritmo matemático embutido no analisador, sendo o resultado fornecido em milímetros.<sup>6</sup>

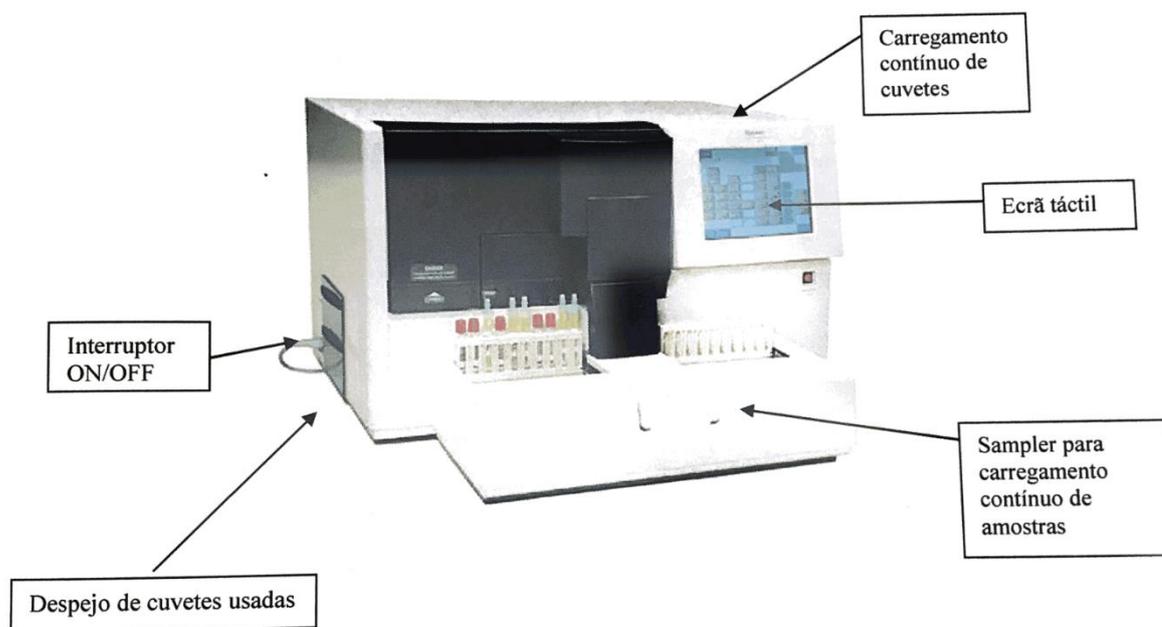
## Coagulação

As diversas determinações analíticas relativas à coagulação têm como objetivo o estudo dos mecanismos de hemostase. A hemostase constitui assim o conjunto de mecanismos que possibilitam a correta circulação sanguínea e a integridade vascular gerindo assim a proporção entre os mecanismos de coagulação e os de eliminação do coágulo para que não haja episódios nem de trombose, nem de hemorragia.<sup>6</sup>

Neste âmbito o autoanalisador utilizado é o *Sysmex CA – 1500*<sup>®</sup>. Certos parâmetros são determinados através da difração da luz laser (difração/scattering da luz), onde estão inseridas as determinações coagulométricas, (Tempo de Protrombina (TP); Fibrinogénio (Fib); Tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT). Para estas determinações é adicionado um reagente ao plasma citratado que irá dar início ao processo

de coagulação, gerando-se um aumento da turvação devido à formação do coágulo de fibrina; este aumento da turvação é detetado pela diminuição da intensidade da luz refratada permitindo assim calcular os diferentes parâmetros e aferir o correto ou não funcionamento das vias extrínseca e intrínseca da coagulação (Figura 5).

Os restantes parâmetros são determinados por métodos cromogénicos, que consistem numa reação de mudança ou desenvolvimento de cor que por sua vez está associada a uma alteração da absorvância.



**Figura 5:** Sysmex CA – 1500®.

Adaptado de <http://tiny.cc/a8ewbz>

### **Tempo de Protrombina (PT):**

O tempo de protrombina mede o tempo de coagulação (em segundos) do plasma citrato na presença de cálcio e tromboplastina (fator tecidual). O fator tecidual ativa o fator VII que por sua vez ativa a via extrínseca indicando desta maneira a eficiência da via extrínseca e refletindo alterações nos fatores II, VII e X (dependentes da vitamina K), no fator V e fibrinogénio. Este parâmetro é usado predominantemente para a monitorização terapêutica de utentes que estejam medicados com anticoagulantes orais antagonistas da vitamina K, como a varfarina.

Como forma de minimizar a disparidade dos resultados do PT, derivados do uso de diferentes tromboplastinas nos laboratórios, concebeu-se uma razão internacional

normalizada (INR), que é constituída pela razão entre o PT do paciente e o PT de um plasma de referência,  $INR = \left(\frac{PT_{paciente}}{PT_{padrão}}\right)^{ISI}$ . O objetivo é padronizar os resultados.

O índice internacional de sensibilidade (ISI) representa a sensibilidade da tromboplastina, se o ISI de uma tromboplastina for alto então uma pequena variação no valor de PT representa uma diferença significativa no poder de anticoagulação, por isto é fortemente recomendado que se usem tromboplastinas com um ISI baixo (próximo de 1).

Um prolongamento no tempo de protrombina pode ser justificado pela terapêutica com anticoagulantes orais (varfarina), pela deficiência ou presença de inibidores dos fatores II, V, VII e X, ou do fibrinogénio, pela deficiência de vitamina K, pode também ser devido a doença hepática, ou coagulação intravascular disseminada (CID). O PT pode estar diminuído caso o indivíduo tenha recebido um suplemento de vitamina K.

Nota: No caso de deficiências nos fatores II (protrombina), X ou V o aPTT também estará aumentado.<sup>6</sup>

### **Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (aPTT):**

Também designado por tempo de cefalina caulino. Avalia os fatores da via intrínseca (XII, XI, IX e VIII) e os da via comum (X, V, II e fibrinogénio), o resultado é expresso em segundos também e indica o tempo necessário para a formação do coágulo.

Neste teste utiliza-se substitutos de fosfolípidos plaquetários, como a cefalina que, sendo uma tromboplastina parcial, é incapaz de ativar a via extrínseca, que requer tromboplastina completa. Por esta razão este teste não é afetado pela deficiência de fator VII.

O aPTT encontra-se normalmente elevado em situações de coagulação intravascular disseminada, doença hepática, administração ou contaminação com heparina ou outros anticoagulantes, presença de um anticoagulante não específico como o anticoagulante lúpico, a presença de medicamentos anticoagulantes orais directos como o rivaroxabano e o dabigatran (agentes anti fator IIa ou anti-Xa) ou deficiência num fator de coagulação com exceção do fator VII (via extrínseca).<sup>6</sup>

### **Fibrinogénio:**

O fibrinogénio é sintetizado no fígado e constitui uma proteína de fase aguda positiva, pelo que aumenta na presença de um processo inflamatório. Ao ser ativado, o fibrinogénio é convertido no final da cascata da coagulação em fibrina pela ação da trombina. Pelo que um valor elevado de fibrinogénio implica a formação de muita fibrina, o que gera um maior

risco trombótico. No caso de um valor baixo de fibrinogénio pode indicar afibrinogenemia, hipofibrinogenemia, doença hepática ou coagulação intravascular disseminada. O teste consiste em medir os segundos necessários à formação do coágulo de fibrina após a adição de trombina a um tubo de plasma citrato (técnica de Clauss).<sup>6</sup>

### **D-Dímeros:**

Os D-Dímeros constituem um dos produtos finais de degradação da fibrina; encontram-se normalmente aumentados no caso de haver uma formação aumentada de coágulos de fibrina, pelo que, normalmente, são utilizados para julgar quadros trombóticos e ajudar no diagnóstico da coagulação intravascular disseminada e da trombose venosa profunda.<sup>6</sup>

### **Anticoagulante Lúpico (Autoanticorpos anti-fosfolípidos):**

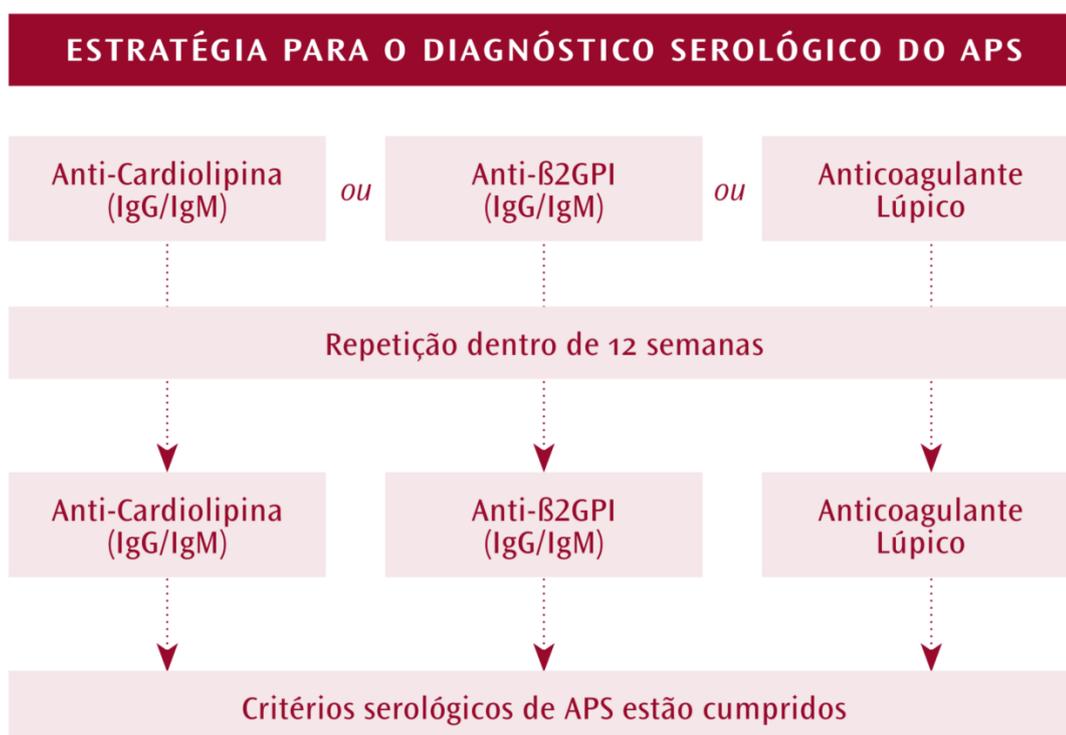
A presença de anticoagulante lúpico (LA) implica a produção de autoanticorpos pelo sistema imunológico, anticorpos esses que inadvertidamente atacam o organismo, especialmente os fosfolípidos e as proteínas associadas a eles nas membranas celulares. Clinicamente, há uma clara associação entre a presença de LA e tromboembolismo venoso recorrente, Acidente Vascular Cerebral, e nas mulheres está ainda relacionado com abortos sucessivos durante os períodos de gravidez (morbilidade na gravidez). Por isso os testes para detetar a presença de um anticoagulante lúpico devem ser efetuados em todos os indivíduos com episódios de trombose venosa ou arterial por explicar, na presença de um aPTT aumentado sem razão aparente e também nas mulheres com abortos espontâneos recorrentes.

O LA não se consegue medir diretamente, nem existe nenhum teste ou procedimento standardizado para o detectar no sangue. Daí se utilizar dois testes para confirmar ou excluir a presença dos autoanticorpos, o aPTT e o *Russell's viper venom time* (dRVVT). Este último teste ajuda a confirmar se a elevação do aPTT se deve a um inibidor específico como um anticorpo contra um dos fatores de coagulação, um inibidor inespecífico como o LA ou ainda devido a uma deficiência num dos fatores de coagulação.

Durante o dRVVT, o *Russell's viper venom* (RVV) ativa o fator X levando à formação de um coágulo de fibrina na presença do fator V, protrombina, fosfolípidos e iões cálcio. O LA prolonga o tempo de coagulação devido ao facto de se ligar aos fosfolípidos e impedir a ação do RVV. Como o RVV ativa diretamente o fator X, deficiências nos fatores VIII, IX e XI não influenciam o teste.

No caso de um resultado positivo, o teste deverá ser repetido dentro de 12 semanas (para evidenciar a persistência dos autoanticorpos e minimizar falsos positivos) e é recomendado que outros testes como os anticorpos anti-cardiolipinas (Ig G/Ig M) e anticorpos anti- $\beta$ 2-glicoproteína I (Anti-  $\beta$ 2GPI) (Ig G/Ig M) sejam realizados. Todos devem ser repetidos dentro de 12 semanas caso sejam positivos como evidenciado na Figura 6.

Estas três determinações (LA, Anti-  $\beta$ 2GPI e Ac anti-cardiolipinas) constituem o diagnóstico serológico do síndrome anti-fosfolípídico (APS), designação dada ao síndrome em que autoanticorpos se ligam a fosfolípidos que se encontram nas membranas celulares das células e plaquetas, interferindo com o processo de coagulação através de processos que não são completamente conhecidos.<sup>6, 7, 8</sup>



**Figura 6:** Diagnóstico Serológico do síndrome anti-fosfolípídico (APS).

Adaptado de <http://tiny.cc/34ewbz>

# Microbiologia

---

No sector de microbiologia trabalha-se com os mais variados tipos de produtos biológicos (urina, fezes, exsudatos, expetoração, líquidos serosos, sangue, entre outros) com o objetivo de averiguar a patogenicidade dos microrganismos presentes.

Desta maneira este sector é essencial para o diagnóstico e orientação terapêutica das doenças infecciosas, sendo efetuado para isso o isolamento e identificação de microrganismos potencialmente patogénicos e realização de testes de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos, quando necessário. Serão abordados os diferentes produtos biológicos e técnicas utilizadas nesta valência.

## Transporte de amostras biológicas após processamento

Por vezes as amostras biológicas precisam de ser transportadas para o exterior do laboratório por variadas razões, tais como enviá-las para um laboratório de referência ou por constituírem microrganismos “alerta”, segundo a norma da direção-geral da saúde número 004/2013 e terem de ser enviadas em cultura pura ao Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA). De modo a que este transporte seja seguro e que seja garantida a segurança da amostra e de quem a transporta, todo o material biológico classificado como infeccioso deve ser embalado em três camadas distintas. A primeira constituída por um material à prova de água, normalmente uma embalagem de plástico rodeada de material absorvente suficiente para absorver qualquer tipo de fluido no caso de rutura. Uma segunda normalmente igual à primeira constituída também por um material impermeável, sem fugas, rodeado de material absorvente, sendo que deve ser incluída uma lista que descreva os conteúdos da amostra entre a segunda e a terceira camada.

Por fim uma terceira camada composta por um envelope de modo a proteger os conteúdos de algum tipo de dano físico ou de outra natureza.<sup>9, 10</sup>

## Urina

Em condições normais, a urina é um líquido estéril, pelo que uma colheita de urina asséptica tal como o nome indica constitui uma amostra de urina que se encontra livre de qualquer tipo de contaminação proveniente da flora perianal, vaginal ou periuretral, de modo a que uma eventual presença de microrganismos na urina possa ser atribuída a uma infeção urinária (UTI) e não a uma contaminação.

Para a colheita deverá ser feita a higiene íntima, recorrendo a toalhas assépticas. A urina, preferencialmente, deverá ser a primeira da manhã (devido à sua maior concentração) ou após duas horas sem urinar. Apenas deverá ser recolhido o jato médio, desprezando-se as primeiras gotas, devendo a urina ser recolhida para um recipiente estéril com uma tampa que vede completamente, de modo a evitar qualquer tipo de fuga. Em caso de necessidade a colheita poderá ser realizada no domicílio, devendo neste caso ser processada no laboratório dentro de duas horas.<sup>11, 12</sup>

As infeções urinárias normalmente advêm de bactérias da flora intestinal saprófita, que invadem o aparelho urinário por via ascendente através da uretra; em casos mais graves poderão dar origem a pielonefrites. O principal grupo bacteriano associado às UTI são as Enterobactérias, especialmente a *Escherichia coli*, mas também podem ser observadas, *Klebsiella* spp, *Proteus* spp, *Pseudomonas* spp, *Enterococcus* spp, *Staphylococcus* coagulase negativa, entre outros.

As amostras são homogeneizadas e usando uma ansa estéril e calibrada para 1 µL são semeadas no meio de cultura *UriSelect*<sup>®</sup> 4, trata-se de um meio cromogénico pelo que possibilita a identificação presuntiva direta dos patogénicos mais comuns em UTI pela cor que desenvolvem na cultura, para outros são necessários testes bioquímicos adicionais. De seguida são incubadas durante 24 horas a 37°C (Figura 7).

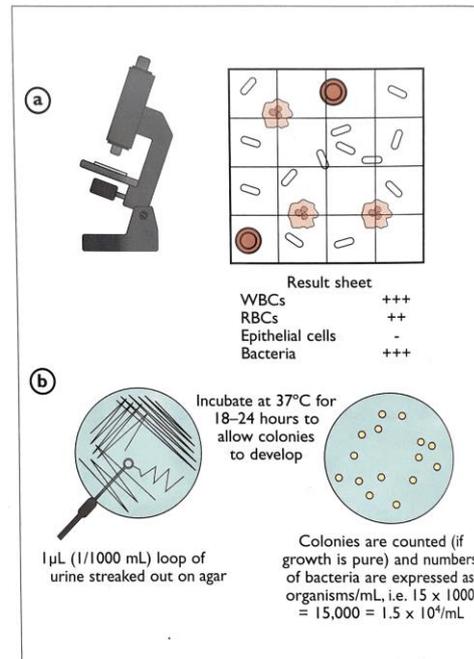


**Figura 7:** Identificação presuntiva direta no meio de cultura *UriSelect*<sup>®</sup> 4. Adaptado de <http://tiny.cc/3uewbz>

No meio *UriSelect*<sup>®</sup> 4 as colónias de *Escherichia coli* são representadas pela cor rosa, as de *Enterococcus* spp pela cor azul e as de *Proteus mirabilis* por uma cor amarela.

Após a sementeira é observado o sedimento urinário com o auxílio de um microscópio ótico onde é visualizada a presença de leucócitos, eritrócitos, células epiteliais, cristais, cilindros e a presença ou não de leveduras (Figura 8).

Depois de passadas as 24 horas as caixas são observadas e é verificado se o crescimento bacteriano é significativo/valorizado (culturas puras com  $\geq 10^3$  unidades formadoras de colónias) (UFC/mL). Caso o crescimento bacteriano seja significativo é escolhida uma colónia pura para se realizarem testes bioquímicos (se necessário) e testes de sensibilidade aos antibióticos.<sup>10,11,12</sup>



**Figura 8:** Processo de sementeira e de observação do sedimento urinário ao microscópio. (Retirado da referência 12)

As colónias são semeadas usando uma ansa estéril e calibrada para 1  $\mu\text{L}$  sendo de seguida semeadas no meio de cultura UriSelect®4. Após a sementeira o sedimento é observado usando um microscópio ótico sendo determinado a presença ou não de leucócitos, eritrócitos, células epiteliais, bactérias ou fungos.

## Fezes

As fezes como produto biológico, ao contrário da urina, possuem uma flora saprófita bastante abundante. As análises mais comuns feitas, usando as fezes como produto biológico, encontra-se a coprocultura, exame parasitológico de fezes e a pesquisa de *Clostridium difficile*.

Na coprocultura a colheita é constituída por três amostras distintas, obtidas em dias consecutivos, recolhidas em recipientes de plástico. Devido à natureza das patologias associadas. Trata-se por norma de fezes diarreicas.

As bactérias pesquisadas incluem *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Campylobacter* spp e *Staphylococcus aureus* sendo também pesquisado *Yersinia* spp se solicitado pelo clínico. Para a realização da sementeira são utilizados meios seletivos como a gelose de Hektoen (HE) e gelose SS, entre outros.

Um caldo de enriquecimento para *Salmonella* spp deve também ser inoculado e subcultivado para os meios seletivos após 24 horas de incubação.

Os meios HE e SS inibem o crescimento de grande parte das outras enterobactérias permitindo visualizar o crescimento da *Salmonella* spp e *Shigella* spp originando colónias lactose negativas, sendo a *Salmonella* spp produtora de H<sub>2</sub>S e por isso as colónias apresentam um centro negro. Os meios são incubados a 37°C durante 24 horas.

Os meios de cultura usados para o isolamento de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* devem conter agentes antimicrobianos que inibam o crescimento da flora normal, mas não o das espécies de *Campylobacter*, (é utilizada a gelose Butzler, que contém cefoperazona, colistina, rifampicina e anfotericina B, o crescimento do *Campylobacter* spp é promovido pela presença de sangue de ovelha no meio). Estas placas incubam-se numa atmosfera de microaerofilia a 42°C e as colónias suspeitas investigam-se as 24 e 48 horas.<sup>10</sup>

12, 13

A pesquisa de *Clostridium difficile* consiste em dois testes, mas ambos partilham o mesmo fundamento imunocromatográfico. O primeiro destina-se a pesquisar a presença de uma enzima do microrganismo, mais concretamente a glutamato desidrogenase (GDH), e o segundo teste que só se realiza se o primeiro der positivo, pesquisa toxinas e o tipo de toxinas que aquela estirpe em concreto possui, a toxina A, a B, ou ambas. Nem todas as estirpes de *Clostridium difficile* produzem toxinas, mas são as toxinas as responsáveis pelo aparecimento de colite pseudomembranosa (Figura 9).



**Figura 9:** Testes imunocromatográficos que pesquisam a GDH (esquerda) e o tipo de toxina (direita).

## Exsudatos genitais

Neste capítulo iremos abordar os exsudatos vaginais e uretrais.

Em relação aos exsudatos vaginais, a flora vaginal endógena é extremamente numerosa e varia significativamente ao longo da vida da mulher, em grande parte devido a variações hormonais, mais concretamente devido a variações a nível dos estrogénios. Desde a puberdade até à menopausa, como ocorre uma maior produção de estrogénios os lactobacilos constituem a parcela maioritária da flora bacteriana, mas após a menopausa ocorre uma diminuição no nível dos estrogénios que leva a uma maior presença de cocos como *Staphylococcus* e *Streptococcus* e de *Enterobacteriaceae*. Pelo que é importante conhecer a idade da utente para poder aferir o estado da sua flora vaginal.

Para além da análise da flora microbiana vaginal, um exsudato vaginal é também utilizado para a pesquisa de *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus* grupo B (*agalactiae*, em gestantes), *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans*, e *Candida glabrata*.

Nos exsudatos vaginais para a colheita são utilizadas duas zaragatoas, (evita-se usar zaragatoas de algodão pois contêm ácidos gordos que podem inibir o crescimento de *Neisseria gonorrhoeae*). As zaragatoas são inseridas no cérvix e rodadas; uma será utilizada para o exame direto (pesquisa de *Trichomonas vaginalis* e leveduras) e a outra para a cultura e coloração de Gram.

Na coloração de Gram é importante avaliar a flora bacteriana.

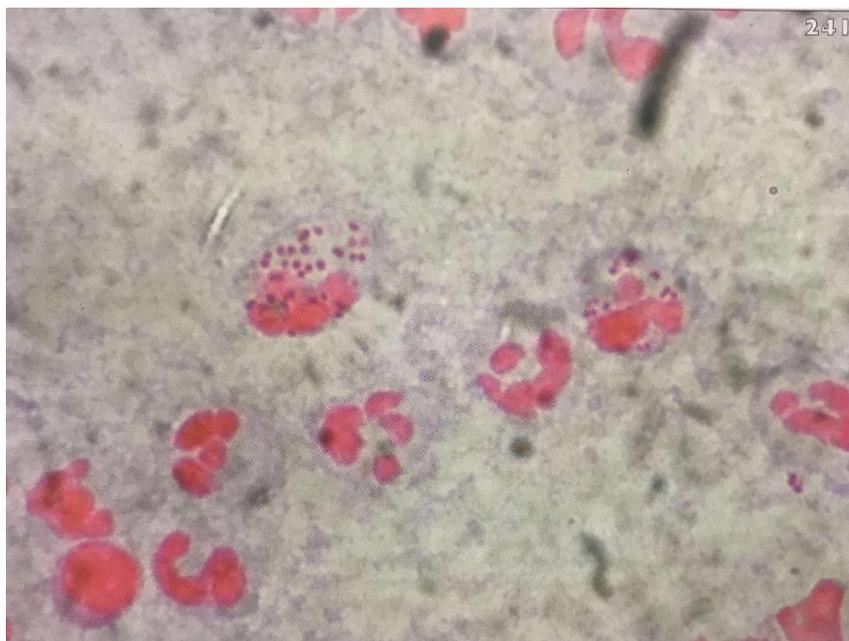
Em infecções como a de *Gardnerella vaginalis* ocorre a substituição dos lactobacilos por outra espécie bacteriana, neste caso a *Gardnerella*. Também característico desta infecção é a presença de clue cells, células epiteliais cobertas de pequenos bacilos gram negativos.

Devem pesquisar-se células polimorfonucleares contendo diplococos caso se suspeite da presença de *Neisseria gonorrhoeae* ou pseudohifas características da *Candida albicans* (Figura 10).

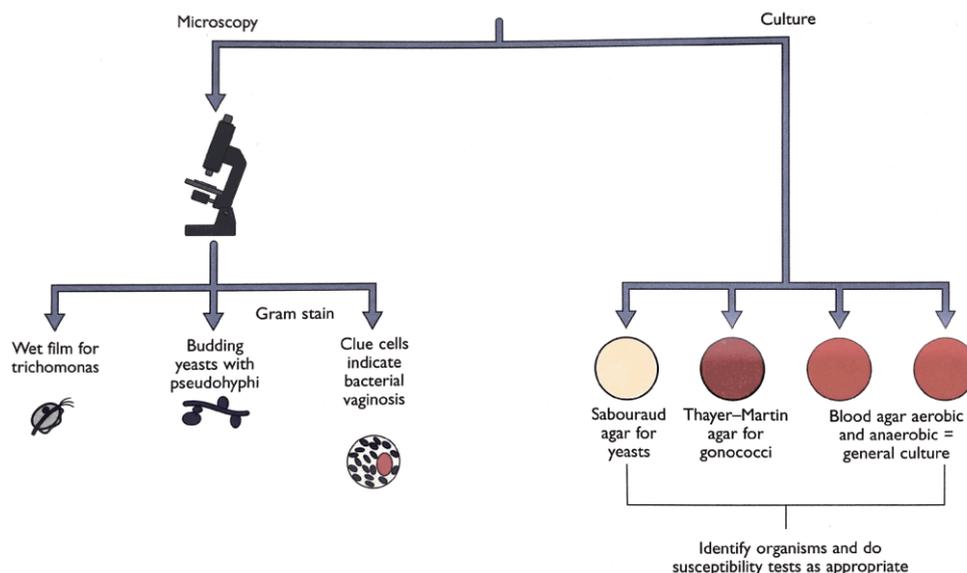
São cultivados diferentes meios devido a variedade de microrganismos patogénicos que poderão fazer parte de cada infecção. A cultura é feita com o auxílio da zaragatoa utilizada na colheita e o isolamento é feito com uma ansa, sendo semeada nos meios *UriSelect*<sup>®</sup> 4, Columbia + Colistina e Ácido nalidíxico (CNA) + 5% de sangue de carneiro (para isolar Gram+ e detetar hemólise), gelose de chocolate + Suplemento Multivitamínico (PVS) + vancomicina, colimicina, anfotericina e trimetoprim (VCAT) (para o isolamento de *Neisseria spp*) e Sabouraud (para isolar *Candida albicans* e *glabrata*).

As culturas realizadas nos meios Columbia e gelose de chocolate são incubados numa atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C durante 48 horas enquanto os meios *UriSelect*<sup>®</sup> 4 e Sabouraud são incubados em aerobiose a 37°C, o primeiro durante 24 horas e o Sabouraud durante 48 horas, sendo observado às 24 e às 48 horas.<sup>10, 12, 13</sup>

O esquema da Figura 11 representa um possível algoritmo de diagnóstico utilizado para investigar um exsudato vaginal, que resume esquematicamente o que foi abordado sobre este produto biológico.

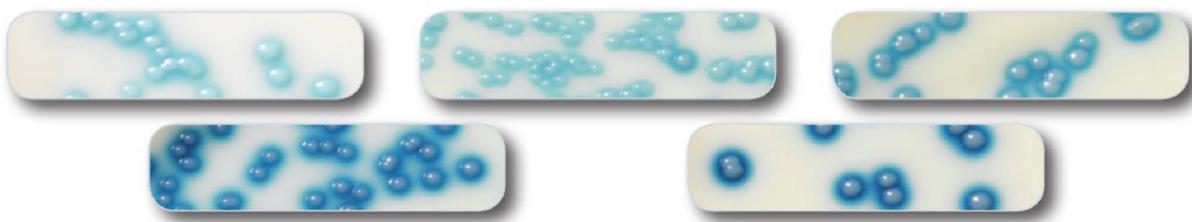


**Figura 10:** Coloração de Gram de um exsudato uretral dum utente masculino, podem-se observar numerosos diplococos e neutrófilos (*Neisseria gonorrhoeae*). (Retirado da referência 12)



**Figura 11:** Algoritmo de diagnóstico utilizado para investigar um exsudato vaginal.  
(Retirado da referência 12)

A pesquisa de *Streptococcus* do grupo B (*Streptococcus agalactiae*) é feita tanto em exsudato vaginal como no exsudato rectal. Este microrganismo constitui parte da flora normal vaginal em 40% das mulheres, mas constitui um risco bastante elevado de causar meningite e sepsis ao recém-nascido durante o parto, por isso o teste é normalmente realizado nas grávidas entre a 34 e a 35 semana de gestação. São usadas duas zaragatoas, uma para o exsudado vaginal e outra para o rectal; na vaginal a colheita é feita no terço inferior da vagina. De seguida ambas as zaragatoas são semeadas no meio cromogénico *StrepBSelect*<sup>®</sup>, que confere às colónias de *Streptococcus agalactiae*, uma cor azul quando semeadas neste meio. São incubados a 37°C durante 24 horas numa atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> (Figura 12).<sup>10, 12</sup>



**Figura 12:** Colónias de *Streptococcus agalactiae*.

Adaptado de <http://tiny.cc/59ewbz>

Nos exsudatos uretrais é feita a pesquisa de *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis*, que causam uretrites e/ou cervicites, mas a uretra também pode ser colonizada por enterobactérias, ou *Candida spp* dando origem a infeções urinárias.

A colheita deve ser feita antes da primeira micção. Deve-se introduzir uma zaragatoa, suavemente e com movimentos de rotação até 2-4 cm, no interior da uretra e repetir esta operação com uma segunda zaragatoa. A primeira será utilizada para o exame direto e a segunda para cultura e realização da coloração de Gram.

Para a cultura são usados os meios Columbia + CNA + 5% de sangue de carneiro e gelose de chocolate + PVS + VCAT incubados numa atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C durante 48 horas.<sup>10, 12</sup>

## Exsudatos nasais

Os exsudatos nasais são maioritariamente usados para a pesquisa de *Staphylococcus aureus*. A colheita é realizada usando duas zaragatoas uma para o exame direto e a segunda para cultura e realização da coloração de Gram. As zaragatoas são inseridas no terço inferior de ambas as fossas nasais e são exercidos movimentos de rotação.

Para a cultura são usados os meios Columbia + CNA + 5% de sangue de carneiro e gelose de chocolate + PVS incubados numa atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C durante 48 horas.

A presença de colónias na gelose Columbia com presença de β-hemólise é indicativa de *Staphylococcus aureus*, podendo ser confirmado com uma prova de coagulase ou usando o teste *Pastorex*<sup>®</sup> *Staph – Plus*. O crescimento na gelose de chocolate sem crescimento na gelose Columbia pode indicar colónias de *Haemophilus influenzae*.<sup>10, 12</sup>

## Exsudatos Faríngeos

Os exsudatos faríngeos por rotina pesquisam apenas *Streptococcus* β-hemolíticos, dos quais fazem parte os *Streptococcus* do grupo A, C e G, sendo os do grupo A (*pyogenes*) os mais prevalentes. Os outros microrganismos que se poderiam encontrar nesta região geralmente não causam faringites agudas, os *Staphylococcus* podem gerar abscessos a nível das amígdalas e *Corynebacterium diphtheriae* faringite membranosa.

Para pesquisa de outros microrganismos como *Neisseria gonorrhoeae* e *Streptococcus* não β-hemolíticos, o clínico deve notificar o laboratório para a pesquisa em concreto destes organismos patogénicos.

Os testes rápidos (imunocromatográficos) para *Streptococcus* do grupo A apesar de fornecerem um tempo de resposta mais rápido possuem uma sensibilidade mais baixa, pelo que devem ser usados apenas como testes de *screening* pois um resultado negativo ainda precisa de ser confirmado pela cultura. Indivíduos assintomáticos não devem ser testados

por rotina pois uma percentagem da população é portadora desta bactéria sem desenvolver infecção.

A colheita deve ser feita usando uma zaragatoa e se necessário uma espátula de madeira de forma a baixar a língua e facilitar o acesso à zona infetada. Deve-se passar a zaragatoa pela região das amígdalas e faringe posterior, tocando nos segmentos que apresentem exsudato, inflamação ou membranas sem nunca tocar na língua, úvula ou mucosa oral de modo a não contaminar a amostra.

A zaragatoa caso se pesquise *Streptococcus* é semeada em Columbia + CNA + 5% de sangue de carneiro e gelose de chocolate + PVS incubados numa atmosfera de 10% CO<sub>2</sub> a 37°C durante 24 horas; caso se pesquise *Staphylococcus* deve-se semear em *UriSelect*<sup>®</sup> 4, Columbia + CNA + 5% de sangue de carneiro e Chapman.<sup>10, 12, 13</sup>

## Líquidos Serosos

Os líquidos serosos são um ultrafiltrado do plasma, derivados das redes capilares das membranas serosas. As membranas serosas são constituídas pela membrana parietal (em contacto com o exterior do órgão) e pela membrana visceral (em contacto com o órgão), entre ambas encontram-se os líquidos serosos que compreendem o líquido pleural, ascítico, peritoneal e pericárdico.

A efusão destes fluidos pode ter duas origens, transudatos, devido a alterações fisiológicas como transtornos no equilíbrio oncótico, causadas devido a inflamações por vezes derivadas de situações clínicas como cirrose, síndrome nefrótica e falha cardíaca. Os exsudatos, por sua vez, resultam da alteração da permeabilidade capilar havendo passagem de proteína para o espaço intermembranar e um consequente aumento da pressão oncótica que leva a uma entrada de água, o que normalmente sucede em situações de infecção microbiana ou cancro.

Devido ao acesso complicado as amostras são normalmente colhidas pelo clínico, sendo que ao laboratório chega apenas a seringa com o produto.

Os drenos abdominais são cultivados em gelose Columbia, *UriSelect*<sup>®</sup> 4, Schaedler Vit K3 (para a pesquisa de anaeróbios), Brain Heart (caldo de enriquecimento) e hemocultura (a ser discutida num capítulo posterior)

Nos aspirados torácicos deve-se fazer a determinação do pH, densidade, proteínas totais, albumina e LDH, devendo a amostra ser centrifugada para estas últimas três determinações. Deve ser feita um esfregaço a partir do sedimento da centrifugação e

contados os eritrócitos e leucócitos (linfócitos e neutrófilos). Mais de 50% de linfócitos é indicativo de tuberculose ou de um processo cancerígeno.

As culturas devem ser incubadas numa atmosfera de 5% a 10% na presença ou não de oxigénio (consoante o microrganismo em questão) a 35°C durante 48 horas sendo observadas às 24 e às 48 horas.<sup>10</sup>

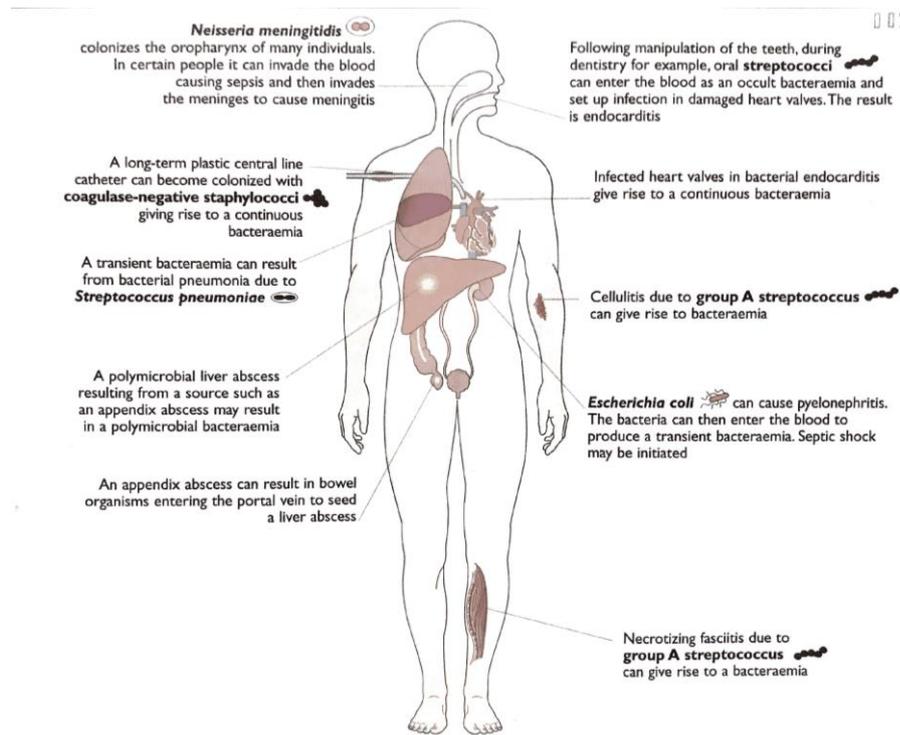
## Sangue

O sangue é normalmente estéril, pelo que um estado de bacteriémia (presença de bactérias no sangue) advém da disseminação de bactérias ou fungos de um foco de infeção, através da corrente sanguínea podendo infetar outras partes do corpo e estabelecer um novo foco de infeção. Os focos de infeção podem extravasar para a corrente sanguínea quer se localizem numa região extravascular como no caso de um abscesso, ou numa região intravascular como numa endocardite (Figura 13).

Uma bacteriémia pode ser definida como temporária (um único episódio com uma duração inferior a 20 minutos), uma situação relativa comum. Pensa-se que o simples ato de lavar os dentes pode libertar um número baixo de bactérias dos dentes que entram na corrente sanguínea. Estes episódios normalmente não têm consequências visto que as defesas do organismo rapidamente as eliminam.

Pode ser intermitente quando o aparecimento da bacteriemia implica o contacto com uma região extravascular como um abscesso ou contínua se envolver uma fonte de infeção intravascular como uma endocardite.

Quando a bacteriémia está associada a um síndrome sistémico de resposta inflamatória (SIRS) passa a constituir um quadro de septicémia. O SIRS é diagnosticado na presença de dois dos seguintes fatores, febre, hipotermia, hipotensão, taquicardia ou leucocitose/leucopenia.



**Figura 13:** Exemplos de fontes de bacteriemia. (Retirado da referência 12)

Uma hemocultura normalmente é o método usado para avaliar um utente com sinais clínicos e sintomas de sepsis. O objetivo da hemocultura consiste em confirmar a presença e identificar o microrganismo causador para que então se possa orientar a terapêutica antimicrobiana. A hemocultura é cultivada num frasco com um meio próprio que possui um anticoagulante (SPS) que inutiliza elementos no sangue que iriam atrasar o crescimento dos microrganismos (complemento, lisossomas e células fagocíticas).

Os três fatores que afetam os resultados são, o volume de sangue colhido (mais importante), a correta realização da colheita (correta desinfeção da pele) e o rácio entre sangue e meio de cultura, no frasco de hemocultura.

A quantidade de microrganismos na corrente sanguínea geralmente é bastante baixa durante episódios de sepsis, chegando a ser inferior a 1 CFU/ml, daí o volume de sangue cultivado ser um elemento tão importante no sucesso da análise.

Devem ser colhidos 2 a 4 conjuntos de frascos, sendo que cada conjunto deve ser constituído por dois, um para cultura aeróbica e outro para cultura anaeróbica. A cultura anaeróbia não serve apenas para isolar anaeróbios estritos, uma atmosfera anaeróbia pode também facilitar o crescimento de bactérias como estreptococos, enterococos, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

O número de frascos a colher não possibilita apenas uma maior probabilidade de ter uma cultura positiva, mas também ajuda a descartar contaminações (falsos positivos).

Em adultos deve ser colhido no mínimo 10ml de sangue por frasco, devendo o frasco para cultura anaeróbica ser inoculado em primeiro lugar para evitar a entrada de ar.

No caso de a colheita precisar de ser realizada em crianças, a quantidade de sangue a extrair é determinada de acordo com a sua idade e peso. Recém-nascidos e crianças com bacteriemias possuem concentrações de bactérias no sangue superiores aos adultos, o que possibilita o uso de um menor volume de sangue para uma colheita. Desta maneira a concentração de bactérias no sangue (no caso de bacteriemia) vai diminuindo à medida que a idade aumenta, pelo que o volume de sangue necessário vai aumentando.

O rácio entre sangue e meio de cultura no frasco de hemocultura deve se situar entre 1/5 e 1/10.

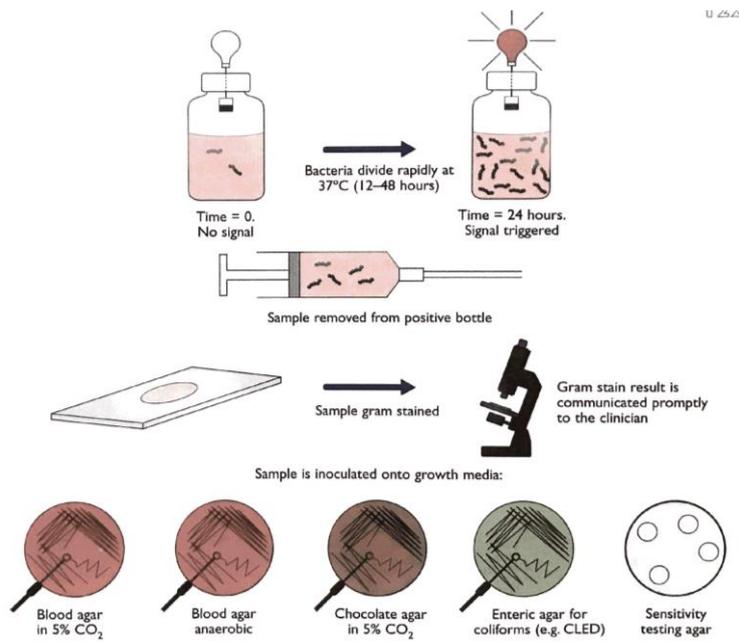
Antes da colheita as tampas de borracha dos frascos de hemocultura devem ser desinfetadas com álcool iodado. Também a pele deve ser desinfetada com álcool iodado, tendo o cuidado de não voltar a palpar a veia depois de desinfetar a pele, fazer a punção e colher a quantidade apropriada de sangue, utilizando uma veia diferente por cada extração e uma extração para cada frasco. Por fim, o sangue é inoculado em cada frasco e é inserido também em cada um deles uma pequena campânula de plástico que permitirá ver se a cultura é positiva ou não (Figura 15).

Ao contrário do que foi anteriormente recomendado, atualmente o intervalo de tempo entre punções não constitui um fator importante para aumentar a sensibilidade do diagnóstico.

As culturas são incubadas a 35°C durante 72 horas e observadas às 24, 48 e 72 horas. Na presença de microrganismos ocorre produção de CO<sub>2</sub> que gera um aumento de pressão no frasco, este aumento de pressão obriga o fluido do frasco a subir na campânula de plástico, permitindo fazer repicagem deste fluido não correndo o risco de contaminar a amostra.

Nas culturas positivas é realizado uma coloração de Gram e as repicagens são cultivadas nos meios de cultura apropriados a partir do contexto clínico fornecido pela coloração de Gram, geralmente gelose Columbia e *UriSelect*<sup>®</sup> 4. Por fim deve ser feito o TSA usando a gelose Müller-Hinton ou a gelose Müller-Hinton com sangue de carneiro, consoante o microrganismo identificado.

O esquema da Figura 14 representa um esquema que resume o que foi abordado sobre a cultura e isolamento de microrganismo a partir deste produto biológico.



**Figura 14:** Protocolo realizado para a cultura e identificação de uma hemocultura.  
(Retirado da referência 12)



**Figura 15:** Hemocultura positiva (esquerda). Adaptado de <http://tiny.cc/2oewbz>

Apesar de todo este processo, o derradeiro desafio que as hemoculturas apresentam para o clínico e para o laboratório é saber distinguir se o microrganismo isolado a partir da hemocultura constitui realmente a entidade responsável pelo episódio de sepsis ou se constitui apenas uma contaminação proveniente da flora bacteriana cutânea do utente, da flora de quem realizou a colheita ou até do próprio ambiente. Sendo que a interpretação recai principalmente em dois fatores, o tipo de microrganismo detetado e o número de frascos em que ele foi detetado. Geralmente as contaminações dão um resultado positivo em apenas um dos frascos (Figura 16).<sup>10, 12, 13, 15, 16</sup>

Interpretação dos resultados positivos em hemoculturas				
Tipo de microrganismo isolado ou identificado	Número de garrafas positivas	Número total de hemoculturas realizadas	Informação Clínica	Ações a tomar
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	1 ou 2 do mesmo par	≥2	Sem evidências clínicas	Provável Contaminação
			Onco-Hematologia, Unidade de cuidados intensivos	Identificar e realizar testes de sensibilidade aos antibióticos. Interpretar na presença da informação clínica e assepsia das técnicas de colheita.
	1	Em todos os contextos	Identificar e realizar testes de sensibilidade aos antibióticos. Interpretar na presença da informação clínica e assepsia das técnicas de colheita.	
	2 ou 3 do mesmo par	≥2	Em todos os contextos	Identificar e realizar testes de sensibilidade aos antibióticos.
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus</i> β-hemolíticos <i>Enterococcus</i> spp. Enterobacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Candida albicans</i> Anaeróbios <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Haemophilus</i> spp. <i>Campylobacter</i> spp.	≥1	Qualquer que seja o número de culturas realizado	Em todos os contextos	Identificar e realizar testes de sensibilidade aos antibióticos.

**Figura 16:** Interpretação de hemoculturas positivas. (Adaptado da referência 12)

## Expetoração

A expetoração é uma análise pedida na presença de uma infeção broncopulmonar de modo a isolar e identificar o microrganismo responsável pela infeção. Apesar de ser uma amostra facilmente adquirida, muita das vezes é de baixa qualidade pois é diluída pela saliva e contaminada pela flora do trato respiratório superior, pelo que um protocolo de colheita rígido deve ser seguido de modo a que se possa garantir a qualidade da amostra.

As amostras deverão ser recolhidas de manhã ao acordar e produzidas por uma tosse profunda, a fim de descolar as secreções. A expetoração é recolhida para frascos de plástico estéreis para posterior processamento no laboratório.

Deve ser feita uma coloração de Gram e sementeira em meios de cultura apropriados (gelose Columbia, Chocolate + PVS + Bacitracina e UriSelect<sup>®</sup> 4). Como organismos isolados temos *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, entre outros. As culturas são incubadas a 35°C durante 24 a 48 horas, na presença ou não de uma atmosfera de 10% de CO<sub>2</sub>.

Uma amostra aceitável, ao ser observada ao microscópio com uma ampliação de 100x deve possuir mais de 25 neutrófilos e menos de 10 células epiteliais por campo, caso contrário deve ser rejeitada e colhida nova amostra.<sup>10, 12, 17</sup>



## Conclusão

---

Com este estágio foi possível consolidar e aplicar todos os conhecimentos adquiridos durante a realização do mestrado de análises clínicas, tal como adquirir e aprender outros conhecimentos fornecidos durante este mesmo estágio.

Foi um privilégio poder experienciar a rotina de um laboratório a nível hospitalar e ter contacto com amostras pouco comuns na rotina laboratorial como líquidos serosos, pelo que todo este aporte de conhecimento revelou-se uma experiência completamente gratificante, pela qual eu estou completamente grato.

Um enorme agradecimento a todos os que tornaram esta experiência uma realidade.



## Bibliografia

---

1. CRUZ RUIZ, M; CONT, M. (2019) - Gestión de los Errores en la Fase Preanalítica del Laboratorio Clínico. **AEFA Lab Clin.** 2 1–13.
2. SULJEVIĆ, Enver *et al.* (2003) - Evaluation of haematology analyzer CELL-DYN 3700 SL. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences.** 3:2 35–41. doi: 10.17305/bjbms.2003.3553.
3. BECKMAN COULTER INC. (2015) - The Coulter Principle. **Beckman Coulter.** 2:317 1-5.
4. BAIN, Barbara J. - **Blood Cells A Practical Guide.** 4th ed. Blackwell Publishing, 2006. ISBN 9781405142656.
5. RODAK, Bernadtte F; CARR, Jacqueline H. - **Clinical Hematology Atlas.** 11th ed. Elsevier Inc, 2013. ISBN 9781455708307.
6. BAIN, Barbara J; BATES, Imelda; LAFFAN, Michael A. - **Dacie and Lewis Practical Haematology.** 12th ed. Elsevier Inc, 2017. ISBN 9780702066962.
7. ROGERS, Heesun J; NAKASHIMA, Megan O; KOTTKE-MARCHANT, Kandice. (2017) - Lupus Anticoagulant Testing: Diluted Russell Viper Venom Time (dRVVT). **Hematopathology: A Volume in the Series: Foundations in Diagnostic Pathology.** 1646, 57-105 doi: 10.1016/B978-0-323-47913-4.00002-1.
8. MOORE, G. W. (2014) - Commonalities and contrasts in recent guidelines for lupus anticoagulant detection. **International Journal of Laboratory Hematology.** 36:3 364–373. doi: 10.1111/ijlh.12227.
9. DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE. (2013) - Vigilância Epidemiológica das Resistências aos Antimicrobianos. 004/2013 1–9.
10. CORNAGLIA, Giuseppe *et al.* - **European Manual of Clinical Microbiology.** 1. ed. ESCMID, SFM, 2012. ISBN 978-2-87805-026-4.
11. MCCARTER, Yvette S. *et al.* (2009) - Laboratory Diagnosis of Urinary Tract Infections. **ASM Press.** 2C 1-34.
12. STRUTHERS, J. Keith; WESTRAN, Roger P. - **Clinical Bacteriology.** 1. ed. Manson Publishing Ltd, 2003. ISBN 1-84076-027-3.
13. TILLE, Patricia M. - **Bailey & Scott Diagnostic Microbiology.** 13. ed. Elsevier Inc, 2014. ISBN 9780323083300.
14. WEEKLEY, Susan M. Novak-Weekley; DUNNE, Michael (2018) - **Blood culture. A key investigation for diagnosis of bloodstream infections.** Biomerieux, 186 517–518.

15. BARON, Ellen Jo *et al.* - Blood Cultures - Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Microbiology. **ASM Press**. 1C (2005).
16. SHARP, Susan E. *et al.* - Lower Respiratory Tract Infections - Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Microbiology. **ASM Press**. 7B (2004).