

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Monografia: Doença de Kawasaki na fase crónica

Monography: Kawasaki disease in the chronic phase

Relatório de Estágio Profissional

Cátia Sofia Olim Oliveira

M
2022



Orientadora:

Professora Doutora Anabela Cordeiro da Silva

Resumo

A doença de Kawasaki é a vasculite mais comum em crianças com menos de 5 anos de idade. Causa a inflamação dos vasos sanguíneos de calibre médio e é a principal causa de cardiopatias adquiridas em crianças, nos países desenvolvidos. Em 1967, foram descritos pela primeira vez, pelo pediatra japonês Tomisaku Kawasaki, cinquenta casos da doença que viria a ter o seu nome.

Várias décadas se passaram, mas a etiologia da doença permanece desconhecida. Pensa-se que esteja relacionada com uma resposta imunológica exagerada a uma infecção, em crianças cuja genética apresente suscetibilidades. Não existe um único agente patogénico ligado à doença de Kawasaki, pois vários registos relatam a origem da infecção associada a diferentes vírus, bactérias ou fungos. Verifica-se uma maior incidência em crianças com descendência asiática. Estudos apontam para alterações na expressão de diversos genes, em crianças que desenvolveram a doença.

O diagnóstico tem por base manifestações clínicas, sinais e sintomas, pois não existe nenhum teste específico para o efeito. Entre as principais manifestações clínicas estão a febre elevada e persistente, alterações nas mãos e pés, como inchaço, vermelhidão e descamação, irritação na pele, conjuntivite bilateral e não exsudativa, alterações nos lábios e na mucosa oral e linfadenopatia cervical.

O tratamento de eleição é a administração de imunoglobulina intravenosa (IVIG), numa única dosagem, e de aspirina, logo que o diagnóstico é feito. Esta terapêutica desempenha uma atividade anti-inflamatória na fase aguda e, na fase subaguda, a aspirina tem uma atividade anti plaquetária. Decorrem vários estudos para averiguar os efeitos de outras terapêuticas, no entanto, a eficácia em asiáticos não se verifica para o resto da população.

A formação de aneurismas nas artérias coronárias é a consequência mais temida desta doença, uma vez que, apesar de poder haver um retrocesso no aneurisma, a parede do vaso sofre alterações que, mais tarde na vida, podem causar outros problemas cardiovasculares, tais como trombose, isquemia do miocárdio, enfarte ou até morte. Deve existir um acompanhamento a longo prazo destes doentes. Dependendo do tamanho do aneurisma, que pode ir de uma ligeira dilatação a um aneurisma gigante, o acompanhamento deve ser diferenciado, pois o risco de problemas cardiovasculares aumenta com o aumento do tamanho do aneurisma. Os doentes devem adquirir hábitos de vida saudáveis e fazer exames, como ecocardiogramas, regularmente.

Palavras-chave: Doença de Kawasaki; Vasculite; Aneurismas da artéria coronária

Abstract

Kawasaki disease is the most common vasculitis in children under 5 years of age. It causes inflammation of medium-sized blood vessels and is the leading cause of acquired heart disease in children in developed countries. In 1967, the Japanese pediatrician Tomisaku Kawasaki described for the first time fifty cases of the disease that would bear his name.

Several decades have passed, but the etiology of the disease remains unknown. It is thought to be related to an exaggerated immune response to an infection in children whose genetics show susceptibility. There is not a single pathogenic agent linked to Kawasaki disease, as several records report the origin of the infection associated with different viruses, bacteria or fungi. There is a higher incidence in children of Asian descent. Studies point to changes in the expression of several genes in children who developed the disease.

The diagnosis is based on clinical manifestations, signs and symptoms, as there is no specific test for this purpose. Among the main clinical manifestations are high and persistent fever, changes in the hands and feet, such as swelling, redness and scaling, skin irritation, bilateral and non-exudative conjunctivitis, changes in the lips and oral mucosa and cervical lymphadenopathy.

The treatment of choice is the administration of intravenous immunoglobulin (IVIG), in a single dose, and aspirin as soon as the diagnosis is made. This therapy performs an anti-inflammatory activity in the acute phase, and, in the subacute phase, aspirin has an antiplatelet activity. Several studies are carried out to investigate the effects of other therapies, however, the effectiveness in Asians is not verified for the rest of the population.

The formation of aneurysms in the coronary arteries is the most feared consequence of this disease, since, although there may be a regression in the aneurysm, the wall of the vessel undergoes alterations that, later in life, can cause other cardiovascular problems, such as thrombosis, ischemia myocardial infarction, heart attack or even death. There must be a long-term follow-up of these patients. Depending on the size of the aneurysm, which can range from a slight dilation to a giant aneurysm, the follow-up must be differentiated, as the risk of cardiovascular problems increases with the increase in the size of the aneurysm. Patients should acquire healthy lifestyle habits and undergo exams, such as echocardiograms, regularly.

Key words: Kawasaki disease; Vasculitis; Coronary Artery Aneurisms

Índice

Índice de figuras/tabelas	VI
Lista de abreviaturas e siglas	VII
Introdução	1
A Doença de Kawasaki	2
• Caracterização da doença	2
• Etiologia e Fatores de risco	2
• Epidemiologia	4
Patofisiologia	7
• Características fisiológicas e manifestações clínicas	7
• Resposta imunológica	9
Diagnóstico diferencial	11
Tratamento	14
Prognóstico	18
• Efeitos a longo prazo	18
• Seguimento clínico	20
Conclusão	23
Referencias	24

Índice de figuras/tabelas

Figura 1 – Possíveis papéis desempenhados pelo ITPKC e pela CASP3 na via de sinalização Ca^{2+} /NFAT _____	4
Figura 2 – A doença de Kawasaki no mundo _____	5
Figura 3 – Incidência anual da doença de Kawasaki em países europeus _____	6
Figura 4 – Manifestações clínicas principais _____	8
Figura 5 – Patofisiologia da vasculite na doença de Kawasaki _____	9
Figura 6 – Angiogramas de aneurismas gigantes _____	14
Figura 7 – Múltiplas funções da IVIG no tratamento da doença de Kawasaki _____	16
Figura 8 – Opções de tratamento após não haver resposta à IVIG _____	17
Figura 9 – Evolução do aneurisma ao longo do tempo _____	19
Figura 10 – História natural das alterações na artéria coronária _____	20
Tabela 1 – Classificação do nível de risco derivado da dilatação ou do tamanho de aneurismas da artéria coronária e seu o seguimento clínico _____	21

Lista de abreviaturas

AHA – *American Heart Association*

CASP3 – Caspase 3

DAMPs – Padrões Moleculares Associados a Danos

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

HLA – Antígeno Leucocitário Humano

IFN- γ – Interferão *gamma*

IL – Interleucina

ITPKC - Inositol 1,4,5-trifosfato 3-cinase

IVIG – Imunoglobulina Intravenosa

IVUS – Ultrassonografia intravascular

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

LDLs – *Low Density Lypids*

LMP – Proliferação miofibroblástica luminal

LMWH – Heparina de baixo peso molecular

mRNA – Ácido Ribonucleico mensageiro

NFAT – Fator nuclear das células T ativadas

NT-proBNP – Porção N-terminal do peptídeo natriurético do tipo B

PAF – Fator ativador de plaquetas

PAF-AH – Acetil-hidrolase do fator ativador de plaquetas

PAMPs – Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PCR – Proteína C Reativa

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

TAC – Angiotomografia computadorizada

Th cell – Célula T auxiliar

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

Treg cell – Célula T reguladora

VS – Velocidade de Sedimentação

γ GT – *gamma* glutamil transferase

Introdução

Uma vasculite caracteriza-se pela inflamação da parede dos vasos sanguíneos. As vasculites podem afetar os vasos de grandes dimensões, os médios e os pequenos (1).

A doença de Kawasaki afeta vasos de calibre médio e é a vasculite mais comum em crianças com menos de 5 anos (2).

Foi descrita, pela primeira vez, em 1967, mas ainda não se conhece a sua etiologia(3). Infecções provocadas por alguns vírus, bactérias ou fungos parecem ser o gatilho para uma resposta imunológica exacerbada, que pode acabar por destruir a parede de vasos sanguíneos, causando aneurismas (principalmente nas artérias coronárias). Alterações na expressão de alguns genes podem estar relacionadas com esta resposta imunológica exagerada (4,5).

Através do estudo epidemiológico da doença de Kawasaki é possível perceber quais os microrganismos que dão origem à infeção mais comuns e quem é mais suscetível a sofrer desta doença (4).

O diagnóstico não é fácil de ser feito e baseia-se nas orientações disponibilizadas pela *American Heart Association* (AHA). A presença de febre elevada inexplicada e prolongada é um sinal essencial. Outras 5 manifestações clínicas são as principais para o diagnóstico: alterações nas extremidades, exantema, conjuntivite, alterações nos lábios e na mucosa oral e linfadenopatia. Quatro destas manifestações aliadas à febre contínua e elevada são suficientes para o diagnóstico da doença de Kawasaki. Alterações em alguns parâmetros laboratoriais também servem de apoio no diagnóstico (1,6–8).

São três as fases em que esta doença se pode dividir: a fase aguda, a fase subaguda e a fase de convalescença. De modo a minimizar as consequências mais graves, a administração de imunoglobulina intravenosa (IVIG) e de aspirina deve ser feita logo que se confirma o diagnóstico, preferencialmente nos primeiros 10 dias. A formação de aneurismas nas artérias coronárias é a consequência mais grave desta doença, pois para além do risco de rutura do aneurisma, pode ocorrer, também, obstrução devida à formação de trombos. A monitorização a longo prazo é muito importante, pois a probabilidade de ocorrência de trombozes, estenoses, isquemias do miocárdio e enfartes é elevada. Esta probabilidade aumenta com o aumento das dimensões do aneurisma, que pode ir de uma pequena dilatação até um aneurisma gigante (7,8).

A Doença de Kawasaki

Caracterização da doença

A Doença de Kawasaki, também conhecida por Síndrome Ganglionar Mucocutânea, foi descrita detalhadamente, em 1967, pelo pediatra japonês Tomisaku Kawasaki (2).

Trata-se da vasculite mais comum em crianças com menos de 5 anos de idade. Caracteriza-se pela inflamação dos vasos sanguíneos de calibre médio, maioritariamente. Pode dar origem a complicações bastante severas ou, eventualmente, à morte (1).

Apesar dos significantes progressos verificados desde a primeira descrição da doença, a sua etiologia permanece desconhecida. Acredita-se que se inicie com uma infeção causada por um microrganismo patogénico, que despoleta uma resposta imunológica anormal em indivíduos com suscetibilidade genética, devida a expressões genéticas anormais e a variantes genéticas de Antígeno Leucocitário Humano (HLA).

Não existe um teste específico que permita o diagnóstico da Doença de Kawasaki, tornando-se o mesmo difícil. Baseia-se em critérios clínicos, sinais e sintomas, e suportada por alguns parâmetros laboratoriais, tais como proteína C reativa, velocidade de sedimentação eritrocitária, contagem de plaquetas. Os primeiros sintomas da vasculite não são específicos, são idênticos a uma inflamação sistémica (febre, cansaço, aumento dos níveis das proteínas de fase aguda). Na doença de Kawasaki, a erupção cutânea, inflamação das mucosas e alterações nas extremidades são sinais que indicam ser uma doença infecciosa (3).

Uma das consequências mais temidas desta doença é o elevado risco de desenvolvimento de anormalidades na artéria coronária.

A principal terapêutica utilizada aquando do diagnóstico da doença de Kawasaki é IGIV.

Um diagnóstico precoce, seguido da terapêutica correta é essencial para minimizar os efeitos da doença.

Etiologia e fatores de risco

A etiologia da doença de Kawasaki permanece desconhecida. Pensa-se que seja uma interação complexa entre fatores genéticos, as infeções e a imunidade (4,5). Várias tentativas foram realizadas para identificar um único agente infeccioso causador da doença, mas sem sucesso. Diversos vírus foram reportados como estando associados à infeção que despoleta a resposta

imunológica, tais como o vírus Epstein-Barr, Citomegalovírus, rotavírus, adenovírus e enterovírus. Existem, também, estudos que associam bactérias e fungos ao início da doença de Kawasaki. A teoria de que ventos podem transportar toxinas ambientais ou agentes infecciosos de umas regiões para outras, assenta nos padrões de ventos troposféricos, cuja presença em diferentes locais pode coincidir com a incidência da doença de Kawasaki (9–11).

O facto de ser mais incidente em crianças com descendência asiática do que em caucasianos relaciona a doença com uma predisposição genética. Estudos sobre a concordância de risco para a doença em gémeos, sobre o aumento da incidência em crianças cujos pais têm histórico da doença e sobre a ocorrência de casos de doença de Kawasaki em irmãos de pacientes afetados, suportam a teoria da predisposição genética (6). Alterações em alguns genes podem estar associadas à suscetibilidade para a doença de Kawasaki, à gravidade dos sintomas, à probabilidade de aneurismas da artéria coronária e/ou à resposta ao tratamento (12).

Os primeiros estudos baseados na genética da doença incidiram no HLA e, alguns genes deste sistema, como o HLA-DRB1, o HLA B5, o Bw51 e o Bw44 estão associados à suscetibilidade da doença de Kawasaki. Existem outros estudos sobre diversos genes suscetíveis que podem ser agrupados em 4 grupos: ativação de células T aumentada (ITPKC, ORAI1, STIM1); sinalização de células B desregulada (CD40, BLK, FCGR2A); apoptose diminuída (CASP3); e alterações na sinalização do fator de transformação do crescimento beta (TGFB2, TGFB2R, MMP, SMAD) (13).

Alguns dos mais amplamente estudados são:

- O gene **ITPKC** codifica uma isoenzima inositol 1,4,5-trifosfato 3-cinase, que regula negativamente a via de sinalização Ca^{2+} /NFAT (fator nuclear das células T ativadas) de ativação de células T, fosforilando o inositol fosfato 3 (IP3). Mutações neste gene impedem a fosforilação do IP3. Elevadas concentrações de IP3 aumentam a libertação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático, aumentando a ativação de células T e, consequentemente, a libertação de interleucina-2 (IL-2). Existe, assim, uma expressão prolongada de células T durante a fase aguda da doença de Kawasaki (13–15).
- A Caspase 3 (**CASP3**) é uma molécula que participa na ativação da morte celular induzida, a apoptose. Cliva o recetor de IP3 e também degrada o NFAT. Mutações no gene diminuem a capacidade de ligação do NFAT às sequências de DNA, reduzindo a expressão do mRNA da CASP3 (13–16).

Na figura 1 está representada a via de sinalização Ca^{2+} /NFAT de linfócito T, com os possíveis papéis desempenhados pelo ITPKC e pela CASP3.

- Alterações nos genes **BLK** e **CD40** estão relacionadas com uma atividade aumentada das células B, na doença de Kawasaki.

Existem diversos outros genes estudados que se relacionam com a patogênese da doença de Kawasaki.

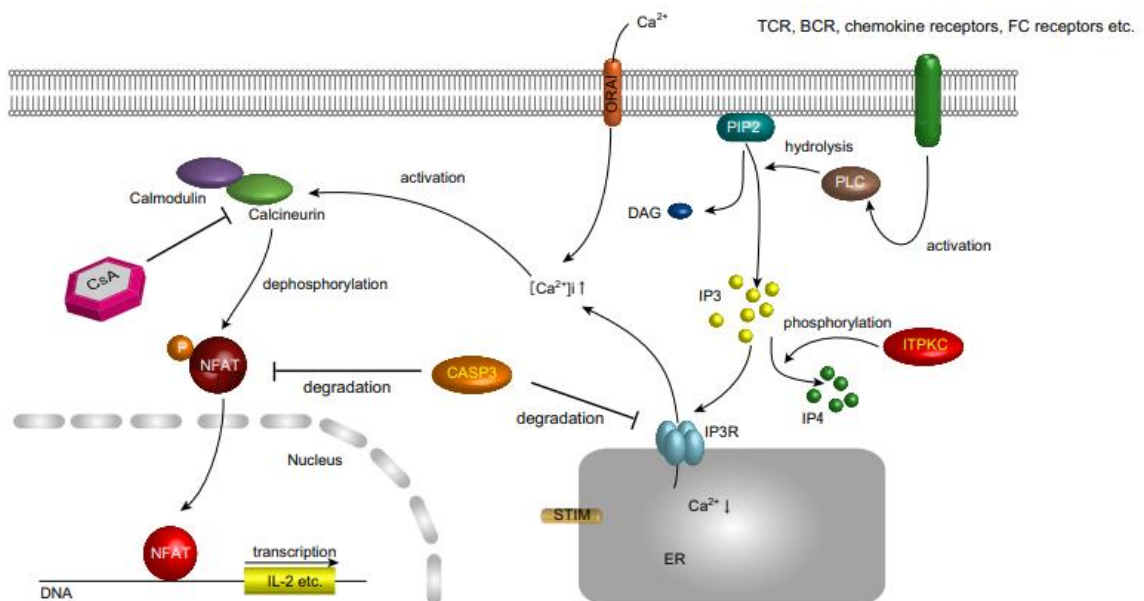


Figura 1 – Possíveis papéis desempenhados pelo ITPKC e pela CASP3 na via de sinalização Ca^{2+} /NFAT. Retirado de: Onouchi Y. The genetics of Kawasaki disease. International Journal of Rheumatic Diseases 2018; 21: 26–30.

Epidemiologia

A doença de Kawasaki é mais incidente em crianças abaixo dos 5 anos de idade, com predominância no sexo masculino relativamente ao sexo feminino: 21 por 100 000 *versus* 15 por 100 000, respetivamente (6). Esta doença foi reportada em mais de 60 países, em todo o mundo (Figura 2) e com uma tendência crescente do número de casos por ano, ao longo do tempo, em alguns desses países.

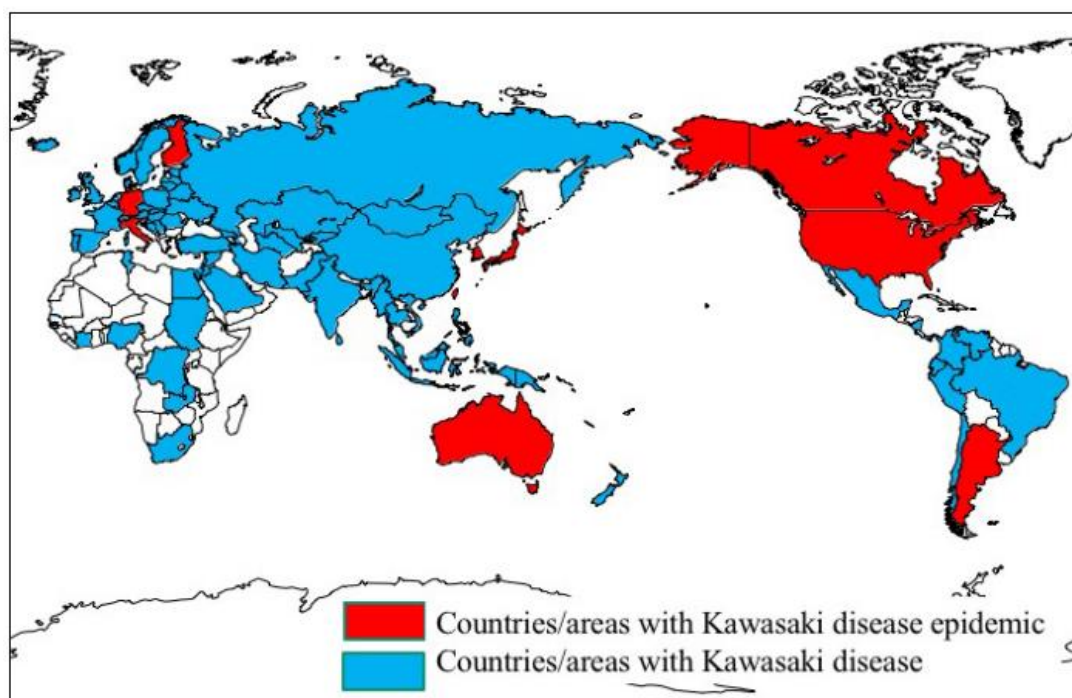


Figura 2 – A doença de Kawasaki no mundo. Retirado de: Nakamura Y. Kawasaki disease: epidemiology and the lessons from it. *Int J Rheum Dis.* 2018 Jan 1;21(1):16–9.

É mais incidente no continente asiático, com um valor anual de 359 casos em crianças com menos de 5 anos, por cada 100 000, no Japão, 197 na Coreia do Sul, 95 em Shangai e 75 em Taiwan (17). Nos anos 1979, 1982 e 1986 ocorreram epidemias da doença de Kawasaki, no Japão (18). Na América do Norte, na Europa, no Chile e na Austrália foram descritos, anualmente, cerca de 10-20 casos em crianças com menos de 5 anos, por cada 100 000. O valor mais elevado nos Estados Unidos foi registado no Havai, com 32 casos por cada 100 000 crianças com menos de 5 anos, devido ao elevado número de crianças com descendência asiática residentes nesta área (17,19).

A figura 3 representa as taxas anuais da incidência da doença de Kawasaki na Europa. Acredita-se que estes valores estejam um pouco aquém dos valores reais, pois os estudos mais recentes demonstram que, após serem publicados, em 2004, os critérios de classificação da doença pela AHA combinado com um maior conhecimento da mesma, melhorou e facilitou muito o seu diagnóstico (17).

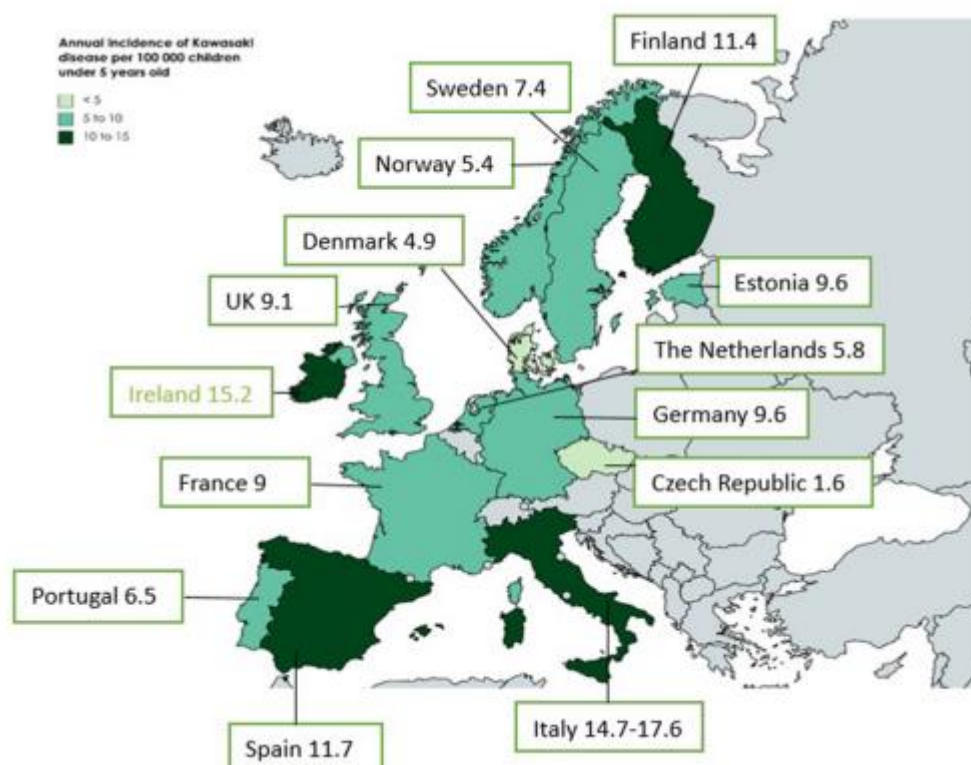


Figura 3 – Incidência anual da doença de Kawasaki em países europeus. O número a verde representa a hospitalização na Irlanda. Retirado de: Píram M. Epidemiology of Kawasaki Disease in Europe. Vol. 9, Frontiers in Pediatrics. Frontiers Media S.A.; 2021.

Existem diversos documentos que reportam uma sazonalidade da doença de Kawasaki que varia de país para país. No Japão, o maior número de casos é verificado em janeiro (inverno), existindo picos mais baixos no verão e, outubro é o mês onde há registo de menos casos. No Canadá também se verifica maior incidência no inverno. Há uma tendência para os meses de inverno, entre janeiro e março, no Hemisfério Norte. Em Taiwan, a doença é mais frequente na primavera. Na Coreia, a predominância é no verão, enquanto na Índia e na Costa Rica ocorre em maior número no outono. No Havai, não se verifica sazonalidade, talvez devido ao clima tropical (14,17).

Patofisiologia

Características fisiológicas e manifestações clínicas

Na doença de Kawasaki evidenciam-se três fases: a fase aguda, a fase subaguda e a fase convalescente. A fase aguda pode durar entre 7 e 14 dias e caracteriza-se por picos de febre alta (acima de 39°C), por alterações nas mucosas, conjuntivite, entre outros. A fase subaguda é normalmente assintomática e ocorre após o episódio febril e dura cerca de 4 semanas. É o período de maior risco de desenvolvimento de problemas cardíacos, como aneurismas da artéria coronária. A fase convalescente é um período assintomático, que ocorre durante 4 a 8 semanas após o início da doença. Pode, ainda, haver risco de desenvolvimento de aneurisma (1,6).

A doença de Kawasaki pode apresentar diversas manifestações clínicas. Entre as principais estão:

- **Febre** – pode exceder os 40°C e, normalmente, não responde a antipiréticos. Se não for administrado tratamento adequado, a febre pode persistir durante 1 a 3 semanas.
- **Alterações nas extremidades** – estas características podem ocorrer, frequentemente na fase aguda e caracteriza-se por eritema das palmas das mãos e das plantas dos pés e endurecimento, por vezes doloroso, destes membros. A descamação dos dedos das mãos e dos pés começa, geralmente, na região periungueal, 2 a 3 semanas após o início da febre e pode estender-se para as palmas das mãos e plantas dos pés (Figura 4-A). Um a dois meses após o início da febre, sulcos transversais profundos nas unhas (linhas de Beau) podem ser observados.
- **Irritação na pele** – geralmente aparece 5 dias após o início da febre. É comum tratar-se de uma erupção maculopapular difusa, de eritrodermia escarlatiniforme ou de erupções semelhantes a eritema multiforme. Envolve, principalmente, o tronco e as extremidades e, a acentuação na virilha com descamação precoce é um aspeto característico (Figura 4-B).
- **Conjuntivite** – normalmente bilateral, a conjuntivite bulbar não exsudativa (Figura 4-C), começa logo após o início da febre e não afeta o limbo, a zona ao redor da íris. Durante a primeira semana de febre é comum a observação de uveíte anterior.
- **Alterações nos lábios e na mucosa oral** – característico da doença de Kawasaki, eritema, ressecamento, fissuras, descamação, rachaduras e sangramento dos lábios; "língua em morango", com eritema e papilas fungiformes proeminentes; e eritema difuso da mucosa orofaríngea (Figura 4-D).

- **Linfadenopatia cervical** – é a menos comum das características clínicas principais. O inchaço dos linfonodos, geralmente, é unilateral, apresenta cerca de 1,5 cm de diâmetro e confina-se ao triângulo cervical anterior (Figura 4-E) (1,7).

Em muitas crianças doentes são observadas artrites que afetam as extremidades inferiores. Durante a primeira semana, é comum ser uma poliartrite de pequenas articulações, passando a uma grande pauciartrite, durante a fase de convalescença. Piúria, hidropisia da vesícula biliar e miocardite são, também, indicadores da doença de Kawasaki (8).



Figura 4 – Manifestações clínicas principais. **A.** Alterações nas extremidades; **B.** Irritação na pele; **C.** Conjuntivite; **D.** Alterações nos lábios e na mucosa oral; **E.** Linfadenopatia cervical. Adaptado de: McCrindle BW, Rowley AH, Newburger JW, Burns JC, Bolger AF, Gewitz M, et al. Diagnosis, treatment, and long-term management of Kawasaki disease: A scientific statement for health professionals from the American Heart Association. *Circulation*. 2017 Apr 25;135(17): e927–99; Petty RE, Laxer RM, Lindsley CB, Wedderburn LR. *Textbook of PEDIATRIC RHEUMATOLOGY* (Seventh edition). 2016. p.467-483.

A manifestação clínica mais temida e que ocorre em cerca de 25% de pacientes não tratados é a formação de aneurismas da artéria coronária. Os aneurismas podem, também, ocorrer em artérias periféricas, não coronárias, mas que, normalmente, estão associados a uma extensão da patologia na artéria coronária. A doença de Kawasaki é a principal causa de cardiopatia adquirida em crianças, nos países desenvolvidos.

Resposta imunológica

A doença de Kawasaki afeta as artérias musculares extraparenquimatosas de tamanho médio, como as artérias coronárias. Caracteriza-se por uma resposta do sistema imunitário, quer inato, quer adaptativo a uma infecção. A ativação do sistema imunitário inato pode dever-se à detecção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e/ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Espécies reativas de oxigênio (ROS) oxidam essas moléculas, incluindo os fosfolípidos da membrana das células danificadas. DAMPs, incluindo S100 e HMGB1, fosfolípidos oxidados e lipoproteínas de baixa densidade (LDLs), ativam as células endoteliais e células do sistema imune inato para produzir ainda mais citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α e IFN- γ , e ROS. Esses processos induzem a ativação do inflamassoma NLRP3, resultando na aceleração da piroptose das células endoteliais e dos monócitos. Proteínas S100, HMGB1, fosfolípidos oxidados, proteína do tipo partícula associada à apoptose, contendo um domínio de recrutamento de caspase, caspase-1 e gasdermina D, são reconhecidas como moléculas relacionadas com a morte celular. Assim, a morte celular pró-inflamatória (piroptose e necrose) de células endoteliais e do sistema imune inato pode desempenhar um papel significativo no desenvolvimento de vasculite na doença de Kawasaki (5,20).

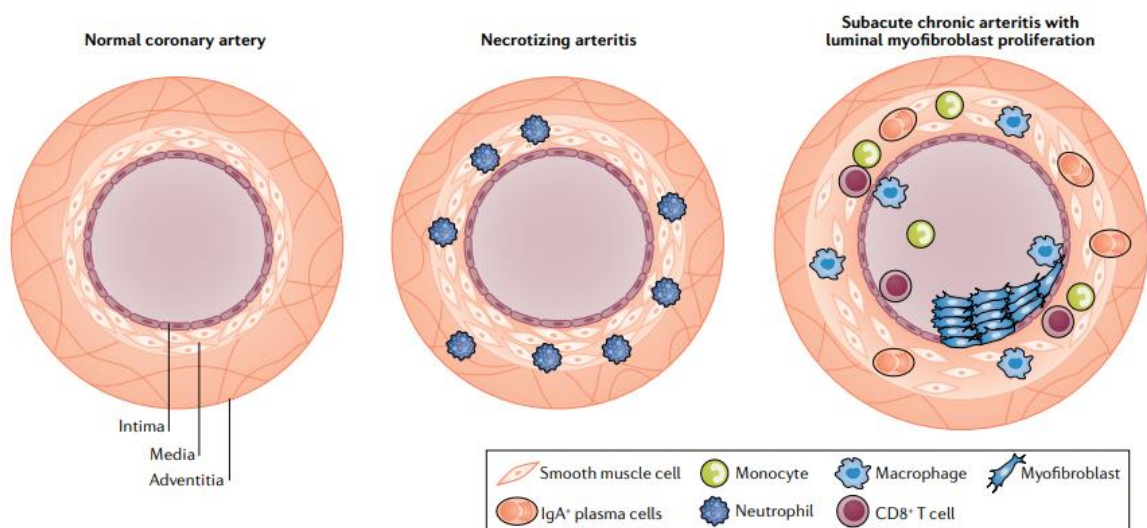


Figura 5 – Patofisiologia da vasculite na doença de Kawasaki. Retirado de: Noval Rivas M, Arditi M. Kawasaki disease: pathophysiology and insights from mouse models. Vol. 16, Nature Reviews Rheumatology. Nature Research; 2020. p. 391–405.

A artéria coronária normal é constituída por três camadas gerais: a túnica íntima, a túnica média e a túnica adventícia. A íntima é composta, principalmente, por células endoteliais, a média de células musculares lisas e a adventícia de tecido conjuntivo. A arteriopatia associada à doença de Kawasaki baseia-se em três processos: arterite necrotizante, vasculite subaguda/crónica e proliferação miofibroblástica luminal (LMP). A arterite necrotizante desenvolve-se nas 2 primeiras semanas da doença e está associada à infiltração neutrofílica, que destrói gradualmente a íntima, a média e algumas porções da adventícia da artéria coronária. Células T CD8⁺, células plasmáticas IgA⁺, monócitos e macrófagos fazem parte do infiltrado inflamatório, durante a arterite subaguda/crónica. Estas células libertam citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF, que contribuem para a proliferação luminal de miofibroblastos. Os miofibroblastos, principalmente derivados de células musculares lisas, e os seus produtos de matriz obstruem progressivamente o lúmen coronário. A vasculite subaguda/crónica persistente e a LMP ocorrem simultaneamente e podem ser observadas ao longo de meses a anos após o início da doença e podem levar a estenose e trombose, após a doença aguda (21).

Esta doença também se relaciona com anormalidades no sistema imunológico adquirido. Isto verifica-se por uma diminuição na contagem absoluta de células T no sangue periférico, pela regulação negativa das vias de sinalização do recetor das células T e do recetor das células B e pela diminuição das células B e T reguladoras durante a fase aguda. Nesta fase, a quantidade de células Th17 (células T auxiliares) é significativamente elevada.

As células T estão associadas à imunopatogenese da doença de Kawasaki, com o ITPKC como seu principal mediador. Funciona como regulador negativo da ativação de células T. Como anteriormente referido, alterações no gene ITPKC aumentam a ativação de células T e, consequentemente, há aumento da produção de citocinas, o que se verifica em pacientes com a doença. Estudos de amostras de soro de pacientes com doença de Kawasaki analisaram os níveis de citocinas de células Th1 e Th2. Foram encontrados níveis aumentados de IL-6, IL-20, IFN- γ (interferão γ) e TNF- α (fator de necrose tumoral- α) antes do tratamento com IVIG, verificando-se uma rápida diminuição nos níveis séricos de IL-6, IL-10 e IFN- γ após o tratamento com IVIG (14,22).

Recentemente, outros estudos também mostraram a existência de um desequilíbrio de células Th (células T auxiliares) e células Treg (células T reguladoras) na doença aguda. As células Th17 são células pró-inflamatórias que segregam citocinas como IL-6, TNF- α e IL-8, após ativar neutrófilos, monócitos e fibroblastos. As células Treg são células anti-inflamatórias que funcionam através da secreção de citocinas como IL-10 e TGF- β para controlar a progressão de doenças inflamatórias e autoimunes. Em crianças com doença aguda, os níveis de células Th17 e das suas citocinas (IL-17, IL-6 e IL-23) era elevado, enquanto as células Treg e o nível de seu fator de

transcrição (FoxP3) eram baixos. Acredita-se que esse desequilíbrio de células Th17/Treg possa estar envolvido na perturbação da homeostase imunológica na doença de Kawasaki (14,23).

Diagnóstico diferencial

Uma vez que não existe um teste específico para o efeito, o diagnóstico da doença de Kawasaki baseia-se no reconhecimento de alguns critérios clínicos. Este é um processo difícil, pois, para além de algumas das manifestações clínicas não serem específicas desta doença, podem, também, existir características atípicas que tornam o diagnóstico um desafio, até para os clínicos mais experientes (7). Pode ocorrer, ainda, a doença de Kawasaki incompleta.

A AHA descreve as diretrizes que devem ser seguidas pelos profissionais de saúde no diagnóstico e gestão da doença de Kawasaki. Apesar das recomendações serem baseadas em evidências, as tomadas de decisão clínica devem ser individualizadas e de acordo com as circunstâncias específicas de cada doente. A existência de 5 ou mais dias de febre, a par com, pelo menos, 4 das 5 manifestações clínicas mais importantes (alterações nos lábios e na mucosa oral, conjuntivite, irritação na pele, alterações nas extremidades e linfadenopatia cervical – Figura 4) são os principais critérios para o diagnóstico da doença de Kawasaki. Quando se verificam pelo menos 4 das 5 manifestações clínicas mais importantes, principalmente eritema e inchaço das mãos e dos pés, o diagnóstico é feito ao 4º dia de febre e, clínicos com maior experiência na área, fazem-no ao 3º dia de febre. É importante ter em conta que, algumas das manifestações clínicas podem já ter desaparecido aquando da chegada ao hospital. Fazer uma revisão cuidadosa dos sinais e dos sintomas anteriores, com a ajuda dos pais, torna-se essencial para o diagnóstico (7,8).

Algumas manifestações clínicas podem induzir um diagnóstico errado, por não serem únicas da doença de Kawasaki: a síndrome de choque na doença de Kawasaki é uma manifestação cardiovascular muito importante, pois é normalmente associada a sepsis bacteriana. Utentes com choque apresentam maior risco de desenvolver alterações na artéria coronária, resistência ao tratamento com IVIG e disfunção do miocárdio; mesmo quando existe uma infeção documentada, o diagnóstico da doença de Kawasaki não deve ser excluído se houver manifestações características da doença, pois a presença de febre e piúria pode ser erroneamente atribuída a uma infeção do trato urinário e o desenvolvimento subsequente de erupção cutânea, olhos vermelhos e lábios vermelhos a uma reação antibiótica; irritabilidade e uma cultura negativa de pleocitose do líquido cefalorraquidiano numa criança com febre prolongada, sugestiva de meningite asséptica (ou se tiver havido administração de antibióticos, meningite parcialmente tratada) podem fazer com que o diagnóstico seja negligenciado; a linfadenite bacteriana é frequentemente confundida com a

linfadenite da doença de Kawasaki. A ultrassonografia e a tomografia computadorizada (TC) são importantes na diferenciação das duas condições: a linfadenite bacteriana é muitas vezes única e tem um núcleo hipocogênico na ultrassonografia, enquanto a linfadenopatia na doença de Kawasaki é geralmente múltipla e está associada a edema na faringe ou flegmão (7,8).

O diagnóstico em bebês deve receber especial atenção e deve ser considerado em caso de febre prolongada aliada a um dos seguintes critérios: irritabilidade em bebês com menos de 6 meses; meningite asséptica sem explicação; choque sem explicação ou com cultura negativa; linfadenopatia cervical que não responde ao tratamento com antibiótico; flegmão na zona da faringe que não responde ao tratamento com antibiótico (8).

Estes critérios são importantes, no entanto, não identificam todas as crianças com a doença. Quando há a existência de febre prolongada sem explicação, associada a alguma das manifestações clínicas mais importantes, o diagnóstico é confirmado pela identificação de aneurismas na artéria coronária. A dilatação da artéria coronária, normalmente, não é detectada no ecocardiograma na primeira semana da doença, o que pode atrasar o diagnóstico.

Existe, então, o diagnóstico da doença de Kawasaki incompleta (ou atípica) que deve ser considerado em qualquer lactente ou criança com febre prolongada sem explicação, com menos de 4 das principais manifestações clínicas e com achados laboratoriais ou com resultados de ecocardiogramas compatíveis (7).

Os achados laboratoriais e as sequelas cardiovasculares parecem ser os mesmos, quer na doença de Kawasaki completa, quer na incompleta.

O estudo laboratorial, apesar de não ser específico e de não fazer parte dos critérios de diagnóstico, serve de suporte no mesmo (3,6,7,24). Alguns pontos importantes desse estudo são:

- Aumento das proteínas de fase aguda de inflamação sistêmica (PCR, VS e alfa1-antitripsina); A PCR normaliza mais rápido do que a VS na resolução da inflamação, devendo ser utilizada na monitorização da inflamação após o tratamento da fase aguda.
- Leucocitose com predominância de granulócitos imaturos e maduros, na fase aguda da doença.
- A partir da segunda semana da doença, a contagem de plaquetas aumenta (trombocitose), atingindo um pico na terceira semana (média de 700 000/mm³) e normaliza 4 a 6 semanas após o início. A trombocitopenia é rara, mas pode ocorrer nas primeiras 1 a 2 semanas da doença. Pode ser um sinal de coagulação intravascular disseminada e é um fator de risco para o desenvolvimento de alterações nas artérias coronárias.

- Frequentemente anemia normocítica e normocrômica, que se resolve com o fim da inflamação; concentrações de hemoglobina superiores a 2 desvios padrão abaixo da média para a idade são observadas em 50% dos pacientes, nas primeiras 2 semanas de doença.
- O exame de urina mostra, geralmente, pleocitose com predominância de células mononucleares, níveis normais de glicose e níveis de proteínas normais. O envolvimento renal pode ocorrer na doença de Kawasaki, mas é incomum.
- Outros fluidos corporais também refletem inflamação: o líquido cefalorraquidiano (LCR) normalmente mostra uma pleocitose mononuclear, sem hipoglicorraquia ou aumento da proteína do LCR; em pacientes com artrite, a artrocentese apresenta, habitualmente, líquido de aparência purulenta, com contagem de leucócitos de 125 000 a 300 000 por mm³, nível de glicose normal e culturas negativas.
- A medição das enzimas hepáticas mostra níveis elevados a moderados de transaminases ou de γ GT (gama glutamil transferase) ou hiperbilirrubinemia leve causada por congestão intra-hepática. Além disso, algumas crianças desenvolvem icterícia obstrutiva por hidropisia da vesícula biliar.
- A hipoalbuminemia é comum e está associada a doença aguda mais grave e prolongada.
- Alguns estudos sugerem que a porção N-terminal do peptídeo natriurético do tipo B (NT-proBNP), indicativa de envolvimento do miocárdio, pode estar elevada em utentes com doença de Kawasaki. No entanto, é um teste inespecífico, sem valores de referência claros para um resultado positivo.
- Valores elevados do fator ativador de plaquetas (PAF) e da sua acetil-hidrolase (PAF-AH) parecem estar envolvidos no risco da doença de Kawasaki. Estudos revelam uma elevação estatisticamente significativa nos níveis de PAF e PAF-AH, na fase aguda da doença, quando comparados com controlos.

As manifestações cardiovasculares na doença de Kawasaki são a principal causa de mortalidade desta doença e podem afetar o pericárdio (derrames pericárdicos), o miocárdio (miocardite e disfunção ventricular sistólica e diastólica), o endocárdio e as válvulas (valvulite e regurgitação valvar) e as artérias coronárias. O exame de eleição para monitorizar estas manifestações é o ecocardiograma, que é um método não-invasivo que permite avaliar a anatomia das artérias coronárias, o funcionamento do miocárdio e anormalidades nas válvulas. Um ecocardiograma normal não invalida o diagnóstico positivo para a doença de Kawasaki, mas a existência de alterações dá mais segurança no diagnóstico. O facto de não existirem alterações

cardíacas nos primeiros 7 dias de doença não significa que não possam vir a existir. O exame deve ser repetido 1 a 2 semanas e 4 a 6 semanas após o tratamento (6,24,25).

O aneurisma da artéria coronária é a manifestação cardiovascular mais comum e é feita a sua medição. De acordo com o Ministério da Saúde Japonês, o tamanho do aneurisma relaciona-se com as dimensões do lúmen interno: pequeno, ≤ 4 mm; médio, > 4 mm e ≤ 8 mm; grande, > 8 mm. Em crianças com mais de 5 anos, o tamanho do aneurisma também se pode relacionar com o seu diâmetro interno comparado a um segmento adjacente: pequeno, $1,5\times$; médio, $1,5\times$ a $4\times$; grande, $> 4\times$. Além das dimensões absolutas do lúmen, tanto o Ministério da Saúde do Japão como a AHA, também utilizam Z-scores (unidades de desvio padrão em relação à média) para classificar as lesões da artéria coronária. Os Z-scores são dimensões coronárias que são ajustadas para a área de superfície corporal, pois as dimensões das artérias coronárias mudam com o tamanho da criança. Assim, a classificação Z-Score apresenta-se: sem envolvimento, sempre que < 2 ; apenas dilatação, $2 \leq < 2,5$ ou se inicialmente < 2 e ocorrer uma diminuição no Z-score durante o acompanhamento ≥ 1 ; aneurisma pequeno, $\geq 2,5$ e < 5 ; aneurisma médio, ≥ 5 e < 10 e dimensão absoluta < 8 mm; aneurisma grande ou gigante, ≥ 10 , ou dimensão absoluta ≥ 8 mm (Figura 6) (7,8,24,25). É importante ter em consideração que, um pequeno erro na medida do diâmetro da artéria coronária se pode traduzir numa maior diferença nos Z-scores, podendo alterar a classificação de risco do utente. Assim como, a medição do peso e da altura do doente deve ser precisa, de modo que o cálculo da área de superfície corporal seja exato.

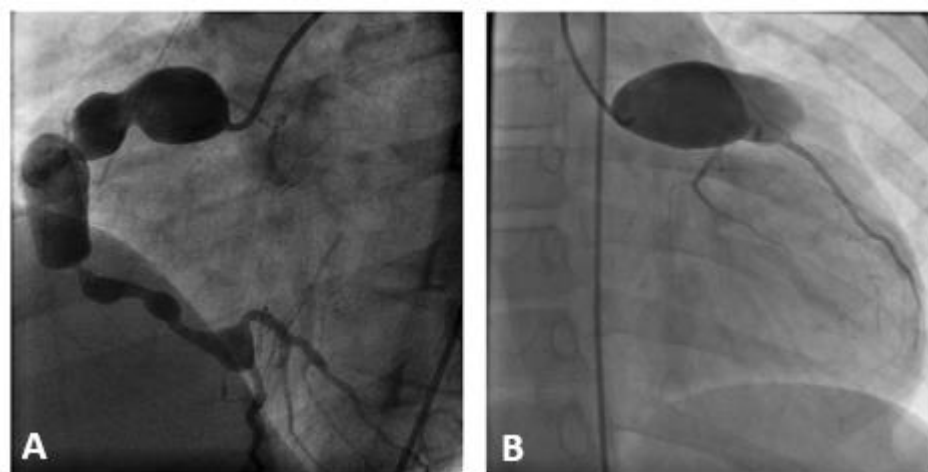


Figura 6 – Angiogramas de aneurismas gigantes. A - Artéria coronária direita com aneurismas gigantes segmentados, o maior com 16 mm de diâmetro. B - Aneurismas gigantes das artérias principal esquerda, circunflexa e descendente anterior esquerda; a artéria coronária descendente anterior esquerda está obstruída distalmente. Adaptado de: Newburger JW, Takahashi M, Burns JC. Kawasaki Disease. 2016.

Tratamento

O principal objetivo do tratamento é eliminar a inflamação sistêmica e tecidual, diminuir o risco de trombose devida à formação de aneurismas e prevenir sequelas a longo-prazo. O tratamento primário, aquando do diagnóstico da doença de Kawasaki, é a administração de IVIG e de ácido acetilsalicílico (aspirina). O ideal é que a IVIG seja administrada nos primeiros 10 dias da doença, com uma dosagem única de 2 g/Kg de IVIG, durante 10 a 12 horas, o que permite diminuir o risco de formação de aneurismas da artéria coronária de cerca de 25% para 5%. A aspirina funciona como anti-inflamatório em conjunto com IVIG, na fase aguda, e exerce a sua atividade anti plaquetária na fase subaguda. A dosagem de aspirina administrada varia de país para país: nos Estados Unidos da América é usada uma dose elevada (80-100 mg/Kg/dia) conforme estabelecido pela AHA; no Japão, a dose recomendada é moderada (30-50 mg/Kg/dia), devido ao risco de hepatotoxicidade com doses elevadas (1,7,24,26). A eficácia de ambas as doses de tratamento, parece ser semelhante (27). Depois da fase aguda, a dose de aspirina que passa a ser administrada é baixa, 3-5 mg/Kg/dia. A decisão de continuar ou descontinuar esta medicação é feita entre a 6ª e a 8ª semana, consoante os resultados do ecocardiograma.

Os mecanismos de ação da IVIG não são totalmente conhecidos, mas acredita-se que passem por: aumento da libertação de autoanticorpos, através da ligação competitiva de recetores FC do IgG; ativação do recetor inibitório Fc (FcγRIIB) em macrófagos; bloqueio de moléculas de adesão importantes para o tráfego de células inflamatórias para o endotélio vascular; e aumento da atividade de células T reguladoras. A presença de anticorpos capazes de neutralizar citocinas, quimiocinas e proteínas ativadas do complemento nas preparações de IVIG ou modulação na sua produção também é uma possibilidade considerada (7,26). A Figura 7 complementa a informação acerca das funções da IVIG.

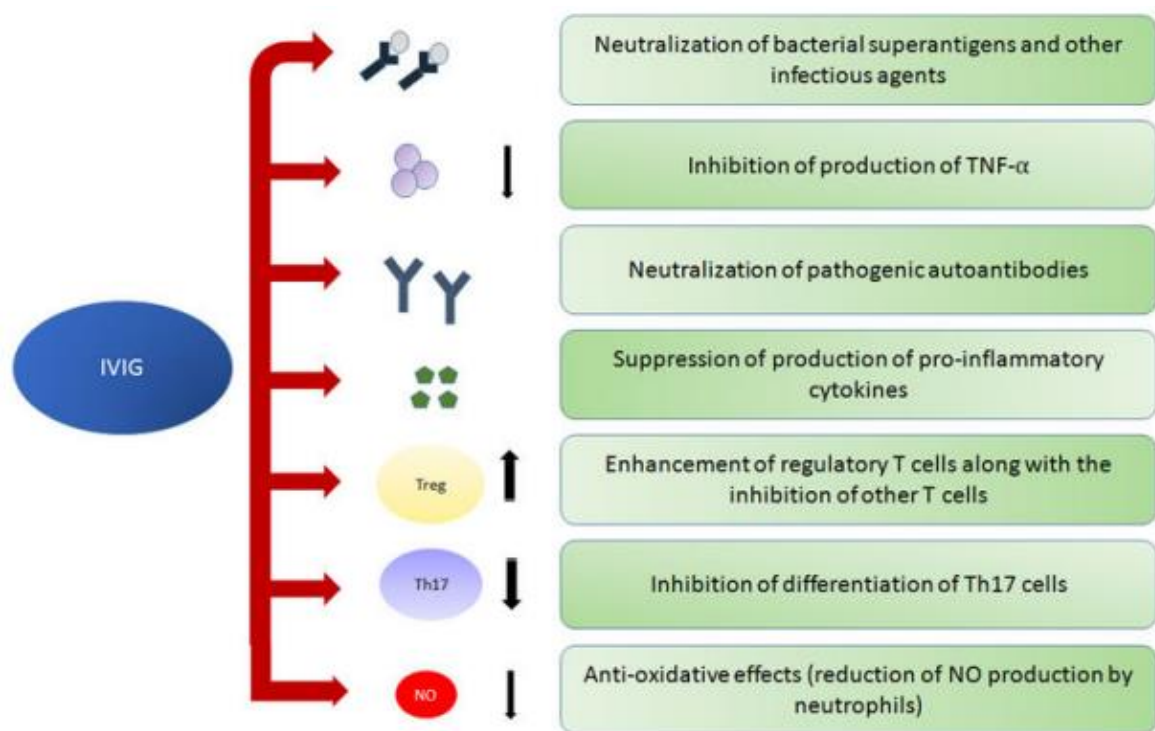


Figura 7 – Múltiplas funções da IVIG no tratamento da doença de Kawasaki. Retirado de: Agarwal S, Agrawal DK. Kawasaki disease: etiopathogenesis and novel treatment strategies. Vol. 13, Expert Review of Clinical Immunology. Taylor and Francis Ltd; 2017. p. 247–58.

A maioria dos doentes tratados com IVIG demonstram uma rápida melhora clínica e cessação da febre, no entanto, cerca de 10% a 20% dos doentes apresentam febre persistente ou recorrente. Estes são considerados resistentes à IVIG e apresentam um risco acrescido de desenvolvimento de alterações nas artérias coronárias, por isso, seria importante estabelecer uma forma de prever esta resistência. Porém, se alguns estudos apontam para diferenças em parâmetros laboratoriais associados à resistência a IVIG, outros não encontram qualquer diferença nos mesmos parâmetros, em resistentes e não resistentes. Surge, assim, a necessidade de existirem tratamentos alternativos para resistentes à IVIG (Figura 8):

- A administração de uma segunda dose de IVIG (2 g/Kg) é recomendada e demonstra eficiência.
- Alguns estudos de observação associaram a administração de corticosteroides (normalmente, metilprednisolona intravenosa, 30 mg/Kg durante 3 dias consecutivos, seguida ou não de prednisolona, 1-2 mg/Kg/dia) a uma melhora nos sintomas, à ausência de progressão nas alterações das artérias coronárias e à ausência de efeitos adversos. Os

esteroides podem regular negativamente os mediadores inflamatórios, prevenir a migração de leucócitos e diminuir a permeabilidade capilar.

- A administração intravenosa de infliximab (5 mg/Kg), que é um anticorpo monoclonal anti-TNF- α , assemelha-se às alternativas anteriores em termos de eficácia (1,7).

Se, mesmo com as alternativas descritas, o doente continuar com inflamação, são necessárias terapêuticas adicionais. A ciclosporina, um inibidor de calcineurina na via de sinalização NFAT (Figura 1), ajuda na resolução da inflamação, mas são necessários mais estudos. O uso de outros anticorpos monoclonais, como a anakinra (uma forma recombinante, não glicosilada, do antagonista do recetor de IL-1), a troca de plasma (usada em último recurso), assim como o recurso a agentes citotóxicos, como a ciclofosfoamida (inibe a síntese de DNA, prevenindo a divisão celular), são opções que necessitam de mais estudos e que devem ser utilizadas, apenas, nos casos mais severos, resistentes a outros agentes (1,6,7,14,24,28).

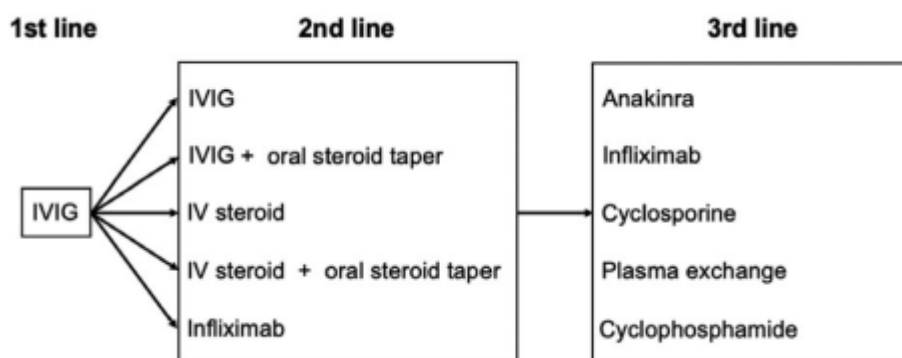


Figura 8 – Opções de tratamento após não haver resposta à IVIG. Retirado de: Butters C, Curtis N, Burgner DP. Kawasaki disease fact check: Myths, misconceptions and mysteries. J Paediatr Child Health. 2020 Sep 1;56(9):1343–5.

Para além do risco de rompimento do aneurisma, a formação de obstrução da artéria coronária é uma das maiores complicações durante a doença aguda. Os fatores que contribuem para a trombose incluem a presença de trombocitose e aumento da adesão plaquetária, inflamação e disfunção endotelial, juntamente com condições anormais do fluxo através de áreas de dilatação grave. É necessário, então, o uso de agentes antitrombóticos. Para pacientes com aneurisma pequeno, a monoterapia com baixa dose de aspirina é suficiente; em utentes com aneurisma médio, a terapia com aspirina deve ser combinada com tienopiridina (por exemplo, clopidogrel) para contrariar a ativação de plaquetas mediada por ADP; nos doentes com aneurismas gigantes, o

tratamento com aspirina é combinado com varfarina ou com heparina de baixo peso molecular (LMWH) (7).

Prognóstico

Efeitos a longo prazo

Estudos patológicos em pacientes com doença de Kawasaki prévia revelam alterações generalizadas, que incluem a infiltração de células inflamatórias na parede arterial, rutura da íntima e da média, proliferação miofibroblástica na íntima e substituição de miócitos por fibroblastos e tecido conjuntivo, dando origem a aneurismas. Devido à disseminação da inflamação cardíaca, ocorrem alterações fibróticas no miocárdio, mesmo em regiões não próximas dos aneurismas. A remodelação arterial ocorre e pode progredir ao longo de meses a vários anos com o desenvolvimento de estenoses coronárias, particularmente na junção entre o aneurisma e a artéria normal. Aneurismas de artérias não coronárias (artérias axilares, ílio-femorais, renais e poplíteas, por exemplo, e raramente em artérias viscerais e cerebrais) também podem ocorrer e devem ser considerados e investigados (29).

O desenvolvimento de aneurismas da artéria coronária durante a fase aguda da doença de Kawasaki leva a um risco elevado de trombose coronária ou de desenvolvimento de lesões estenóticas, ao longo da vida, que podem levar a isquemia do miocárdio, enfarte ou até à morte. O risco de trombose é mais elevado nos primeiros 2 anos após o episódio agudo da doença, mas persiste toda a vida. Cerca de 50-60% dos aneurismas coronários ficam resolvidos ao fim de 1-2 anos, no entanto, os aneurismas grandes ou gigantes persistem (Figura 9). Estes últimos, dentro de 30 anos após a doença inicial, associam-se a um risco de cerca de 50% de obstrução coronária trombótica, estenoses progressivas que requerem revascularização ou síndrome coronária aguda. Podem, também, ocorrer calcificação, insuficiência cardíaca e arritmias graves, mais tarde, na vida (7,30).

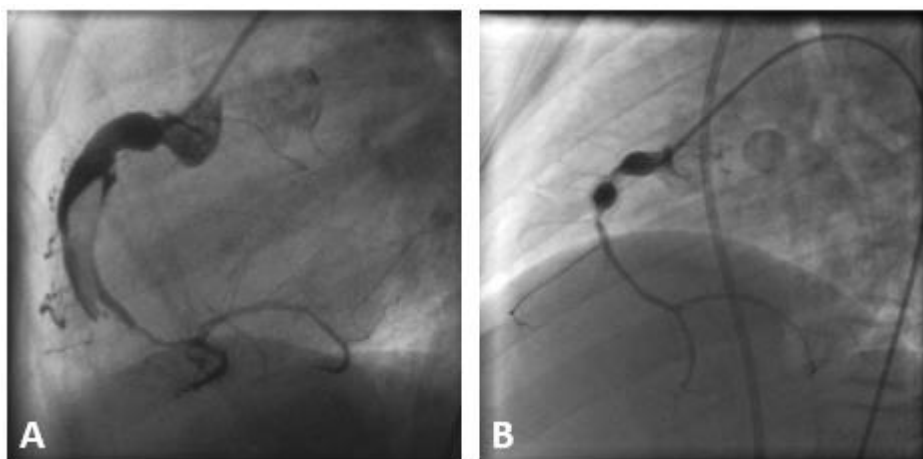


Figura 9 – Evolução do aneurisma ao longo do tempo. A - Angiografia coronária direita, obtida 1 ano após o início da doença, quase preenchida com o trombo. B - Angiografia coronária direita, obtida 7 anos depois. Adaptado de: Newburger JW, Takahashi M, Burns JC. Kawasaki Disease. 2016.

Na Figura 10 é possível observar a história natural das alterações na artéria coronária, em que a progressão para uma dimensão luminal normal, não significa que a artéria cicatrizou e ficou normal e totalmente saudável. A estrutura da parede arterial pode ser visualizada, de forma não invasiva, por ultrassonografia intravascular (IVUS), que tem sido usada para demonstrar espessamento simétrico e assimétrico da parede em aneurismas, em que se observam áreas de alterações fibrogordurosas, núcleo necrótico e calcificação densa (7).

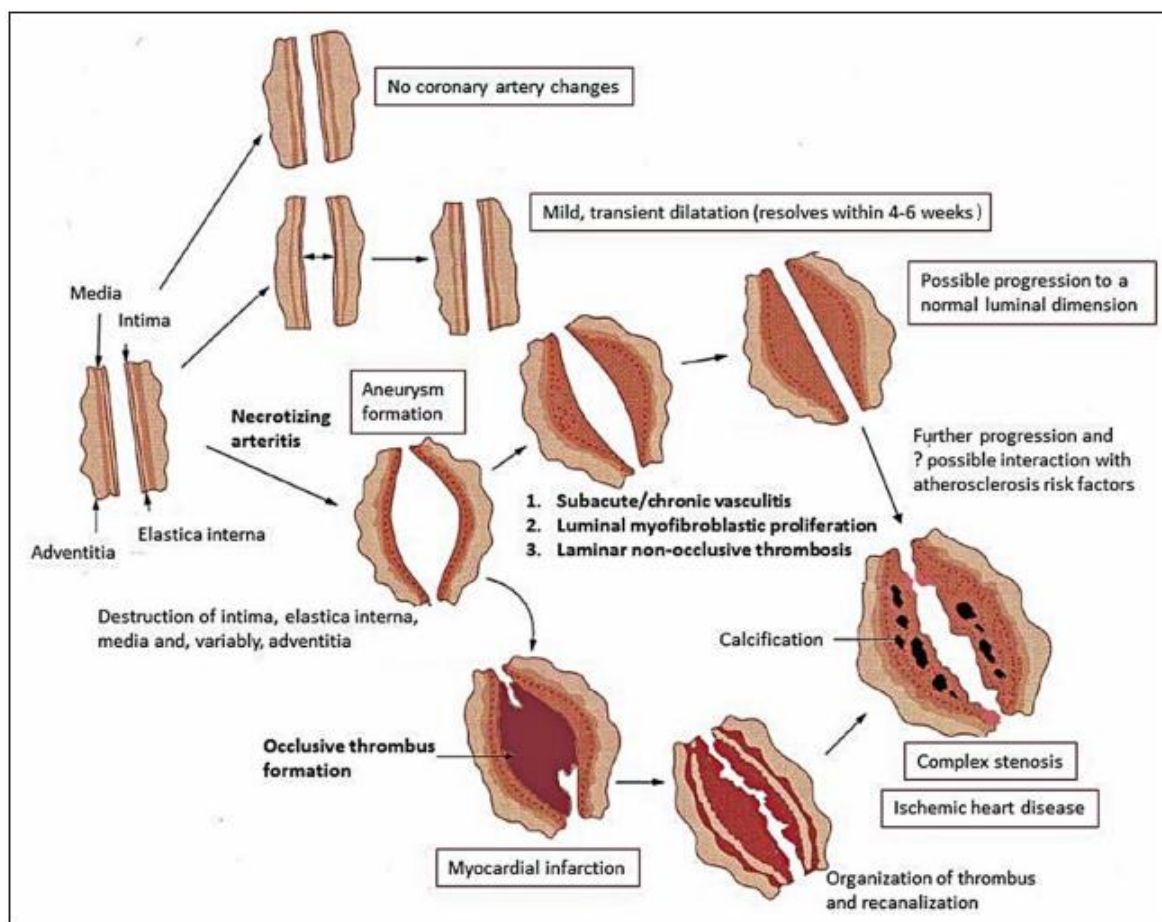


Figura 10 – História natural das alterações na artéria coronária. Retirado de: McCrindle BW, Rowley AH, Newburger JW, Burns JC, Bolger AF, Gewitz M, et al. Diagnosis, treatment, and long-term management of Kawasaki disease: A scientific statement for health professionals from the American Heart Association. *Circulation*. 2017 Apr 25;135(17): e927–99.

Seguimento clínico

O seguimento clínico a longo prazo baseia-se na prevenção da trombose e na sua detecção precoce, assim como da estenose, quando ocorrem. Baseia-se, também, em medidas gerais para reduzir o risco cardiovascular, tais como a redução de lípidos, o controlo da hipertensão e a cessação do tabagismo, e no apoio aos doentes e aos seus familiares para um estilo de vida saudável (29).

Relativamente aos testes cardiovasculares, durante o acompanhamento a longo prazo, as medidas ecocardiográficas do lúmen da artéria coronária tornam-se progressivamente menos confiáveis à medida que as crianças crescem e a parede torácica se torna mais espessa. A ecocardiografia também é menos confiável para a detecção de estenose ou trombose vascular. Por estas razões, técnicas avançadas de imagem, incluindo angiotomografia computadorizada (TAC) e

angiorressonância magnética, são cada vez mais usadas. Os exames para verificar a ocorrência de isquemia do miocárdio são ecocardiograma de stress e ressonância magnética de stress. O stress é induzido por exercício físico ou farmacologicamente (dobutamina ou adenosina) (24).

A Tabela 1 apresenta a classificação do nível de risco atribuído de acordo com a dilatação ou tamanho de aneurisma coronário. O seguimento clínico a longo prazo de crianças com doença de Kawasaki deve ser sempre feito. Casos com aneurismas de menores dimensões podem ser seguidos por um cardiologista durante um tempo mais curto, passando para o seguimento no médico de família, mas casos com aneurismas gigantes devem ser seguidos toda a vida pelo cardiologista.

Tabela 1 – Classificação do nível de risco derivado da dilatação ou do tamanho de aneurismas da artéria coronária e seu o seguimento clínico. Retirado de: Advani N, Sastroasmoro S, Ontoseno T, Uiterwaal C. Long-Term outcome of coronary artery dilatation in Kawasaki disease. Ann Pediatr Cardiol. 2018 May 1;11(2):125-9.

Classification of risk level	Description of coronary arteries	Follow-up interval	Imaging required to assess for inducible ischaemia (stress echo or stress MRI)	PSP	Regional specialist Kawasaki disease clinic
1	No involvement at any time point (Z score<2)	2 weeks 6 weeks 6 months 12 months Discharge if normal at 12 months.	None	No	No—annual cardiac and general health review with GP recommended*
2	Dilation only (2<Z scores≤2.5): resolves within 1 year	2 weeks 6 weeks 6 months 12 months Discharge if normal at 12 months	None	No	No—annual cardiac and general health review with GP recommended*
3	Small aneurysm (2.5≤Z score<5): (a) current or persistent, (b) decreased to normal or Z score <2.5	2 weeks 6 weeks 6 months 12 months Annual review	Coronary angiography (preferably CT) at 12 months as baseline. Consider stress imaging for inducible myocardial ischaemia every 2 years. Imaging (echo) for coronary surveillance annually	Yes	Yes
4	Medium aneurysm (5≤Z score<10): (a) persistent aneurysm, (b) decreased to normal or Z score<2.5	2 weeks 6 weeks 6 months 12 months Annual review	Coronary angiography (preferably CT) at 12 months as baseline. Consider stress imaging for inducible myocardial ischaemia annually. Imaging (echo, CT† or MRI) for coronary thrombus surveillance annually.	Yes	Yes
5	Giant aneurysm (Z score≥10 or ≥8 mm): (a) persistent giant aneurysm, (b) persistent aneurysm (but regressed to medium or small aneurysms), (c) regressed to normal dimensions	2 weeks 6 weeks 3 months 6 months 9 months 12 months Then every 6 months	Coronary angiography (preferably CT) at 6–12 months as baseline. Consider stress imaging for inducible myocardial ischaemia annually. Imaging (echo, CT† or MRI) for coronary thrombus surveillance 6 monthly.	Yes	Yes

*GP review should include clinical examination, blood pressure measurement, general health discussion and advice on avoidance of cardiovascular risk factors and lifestyle choices—including maintaining a healthy weight, reducing risk of diabetes, avoiding smoking and taking regular exercise. This provides the opportunity to discuss any parent or patient questions and concerns.
†CT should not be used repeatedly if possible. Use MRI or ultrasound where possible, to reduce radiation exposure.
ADP, Adenine di-Phosphate; AHA, American Heart Association; FBC, Full blood count; GP, General Practitioner; PSP, person-specific protocol.

Para além dos exames imagiológicos regulares, é importante haver um aconselhamento para um estilo de vida saudável. Evitar fatores de risco cardiovascular é essencial. Para isso, uma

alimentação saudável, pobre em gordura animal, deve ser aconselhada. Deve monitorizar-se a tensão arterial, o perfil lipídico, o índice de massa corporal (evitar diabetes). Um estilo de vida sedentário deve ser evitado, praticando exercício físico regular e adequado. Pacientes com histórico de doença de Kawasaki devem evitar o tabagismo. Pode ser necessário recorrer a tromboprofilaxia. O aconselhamento a nível reprodutor e contraceptivo, na idade certa, também deve ser tido em conta.

O exercício físico deve ser praticado e adequado à severidade da doença de Kawasaki. Desportos competitivos devem ser evitados por pacientes com aneurisma gigante e desportos de contato corporal devem ser evitados por quem toma anticoagulantes.

O acompanhamento psicológico também é importante nas crianças e ao longo das várias fases da sua vida, pois vivem em stress pela elevada probabilidade de sofrerem eventos cardiovasculares graves (29).

Conclusão

Apesar da doença de Kawasaki ter sido descrita, pela primeira vez, há várias décadas, ainda há algumas questões sem uma resposta satisfatória. É importante continuar com investigações no sentido de:

- perceber qual a etiologia da doença;
- estudar biomarcadores com o intuito de criar um teste de diagnóstico;
- compreender os mecanismos da patogénese da doença, de modo a ser possível substituir a administração de IVIG por terapêuticas mais direcionadas;
- decifrar as influências genéticas na suscetibilidade e no resultado da doença.

É muito importante manter o seguimento clínico de utentes com aneurismas da artéria coronária, pois o risco de estenoses, trombozes e isquemia do miocárdio é muito elevado. Manter um estilo de vida saudável é essencial para minorar as consequências.

Todos os doentes que tiveram a doença de Kawasaki devem fazer referência a ela, no seu historial clínico.

Referências

1. Petty, R. E., Laxer, R. M., Lindsley, C. B., Wedderburn, L. R. Textbook of pediatric rheumatology (Seventh edition). 2016. Pag. 448-451; 467-483.
2. Kawasaki, T. Kawasaki disease. *Int. J. Rheum. Dis.* 2014; 17: 596-600.
3. Sundel, R. P. Kawasaki disease. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 2015; 41: 63-73.
4. Yim, D., Curtis, N., Cheung, M., Burgner, D. Update on Kawasaki disease: Epidemiology, aetiology and pathogenesis. *Journal of Paediatrics and Child Health*. 2013; 49: 704-708.
5. Hara, T., Yamamura, K., Sakai, Y. The up-to-date pathophysiology of Kawasaki disease. *Clinical and Translational Immunology*. 2021; 10: 537-540.
6. Rife, E., Gedalia, A. Kawasaki Disease: an Update. *Current Rheumatology Reports*. 2020; 22: 75.
7. McCrindle, B. W., Rowley, A. H., Newburger, J. W., Burns, J. C., Bolger, A. F., Gewitz, M., et al. Diagnosis, treatment, and long-term management of Kawasaki disease: A scientific statement for health professionals from the American Heart Association. *Circulation*. 2017; 135: e927-e999.
8. Singh, S., Jindal, A. K., Pilania, R. K. Diagnosis of Kawasaki disease. *Int J Rheum Dis.* 2018 Jan 1; 21(1): 36-44.
9. Rodó, X., Ballester, J., Cayan, D., Melish, M. E., Nakamura, Y., Uehara, R., et al. Association of Kawasaki disease with tropospheric wind patterns. *Scientific Reports*. 2011; 1: 152.
10. Rodó, X., Curcoll, R., Robinson, M., Ballester, J., Burns, J. C., Cayan, D. R., et al. Tropospheric winds from northeastern China carry the etiologic agent of Kawasaki disease from its source to Japan. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jun 3; 111(22): 7952-7957.
11. Jorquera, H., Borzutzky, A., Hoyos-Bachilloglu, R., García, A. Association of Kawasaki disease with tropospheric winds in Central Chile: Is wind-borne desert dust a risk factor? *Environ Int.* 2015 May 1; 78: 32-38.
12. Dietz, S. M., van Stijn, D., Burgner, D., Levin, M., Kuipers, I. M., Hutten, B. A., et al. Dissecting Kawasaki disease: a state-of-the-art review. *Eur J Pediatr*. 2017; 176(8): 995-1009.
13. Kumrah, R., Vignesh, P., Rawat, A., Singh, S. Immunogenetics of Kawasaki disease. Vol. 59, *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. 2020; 59: 122-139.
14. Agarwal, S., Agrawal, D. K. Kawasaki disease: etiopathogenesis and novel treatment strategies. *Expert Review of Clinical Immunology*. 2017; 13: 247-258.
15. Onouchi, Y. The genetics of Kawasaki disease. *International Journal of Rheumatic Diseases*. 2018; 21: 26-30.

16. Onouchi, Y., Ozaki, K., Buns, J. C., Shimizu, C., Hamada, H., Honda, T., et al. Common variants in CASP3 confer susceptibility to Kawasaki disease. *Hum Mol Genet.* 2010 Apr 27; 19(14): 2898-2906.
17. Piram, M. Epidemiology of Kawasaki Disease in Europe. *Frontiers in Pediatrics.* 2021; 9.
18. Uehara, R., Belay, E. D. Epidemiology of kawasaki disease in Asia, Europe, and the United States. *J Epidemiol.* 2012; 22(2): 79-85.
19. Nakamura, Y. Kawasaki disease: epidemiology and the lessons from it. *Int J Rheum Dis.* 2018 Jan 1; 21(1): 16-19.
20. Yeung, R. S. M. Kawasaki disease: Update on pathogenesis. *Current Opinion in Rheumatology.* 2010; 22: 551-560.
21. Noval, R. M., Arditi, M. Kawasaki disease: pathophysiology and insights from mouse models. *Nature Reviews Rheumatology.* 2020; 16: 391–405.
22. Wang, Y., Wang, W., Gong, F., Fu, S., Zhang, Q., Hu, J., et al. Evaluation of intravenous immunoglobulin resistance and coronary artery lesions in relation to Th1/Th2 cytokine profiles in patients with Kawasaki disease. *Arthritis Rheum.* 2013 Mar; 65(3): 805-814.
23. Jia, S., Li, C., Wang, G., Yang, J., Zu, Y. The T helper type 17/regulatory T cell imbalance in patients with acute Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol.* 2010 Oct; 162(1): 131-137.
24. Newburger, J. W., Takahashi, M., Burns, J.C. Kawasaki Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2016; 67: 1738–1749.
25. McCrindle, B. W., Cifra, B. The role of echocardiography in Kawasaki disease. *Int J Rheum Dis.* 2018 Jan 1; 21(1): 50-55.
26. Lo, M. S., Newburger, J. W. Role of intravenous immunoglobulin in the treatment of Kawasaki disease. *Int J Rheum Dis.* 2018 Jan 1; 21(1): 64-69.
27. Rahbarimanesh, A., Taghavi-Goodarzi, M., Mohammadinejad, P., Zoughi, J., Amiri, J., Moridpour, K. Comparison of High-Dose versus Low-Dose Aspirin in the Management of Kawasaki Disease. *Indian Journal of Pediatrics.* 2014; 81: 1403.
28. Butters, C., Curtis, N., Burgner, D. P. Kawasaki disease fact check: Myths, misconceptions and mysteries. *J Paediatr Child Health.* 2020 Sep 1; 56(9): 1343-1345.
29. Brogan, P., Burns, J. C., Cornish, J., Diwakar, V., Eleftheriou, D., Gordon, J. B., et al. Lifetime cardiovascular management of patients with previous Kawasaki disease. *Heart.* 2020; 106: 411-420.
30. Advani, N., Sastroasmoro, S., Ontoseno, T., Uiterwaal, C. Long-Term outcome of coronary artery dilatation in Kawasaki disease. *Ann Pediatr Cardiol.* 2018 May 1; 11(2): 125-129.



MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio Profissional

Cátia Sofia Olim Oliveira

M
2022



Orientador:

Dr. António Fernandes

Agradecimentos

Agradeço ao Dr. António Fernandes e a toda a equipa técnica do Laboratório Germano de Sousa do Hospital CUF de Viseu, por toda a disponibilidade mostrada em ajudar-me, ensinar-me e explicar-me todo o funcionamento do laboratório. Foram excecionais!

Agradeço, também, ao engenheiro João Ferraz que foi a pessoa com quem falei para me ser permitido fazer o estágio neste laboratório.

Ao Nuno, o meu namorado, pelo apoio incondicional e por me motivar a lutar sempre pelos meus objetivos.

À minha família, que sempre me apoiou em todas as decisões.

Resumo

A área das análises clínicas tem uma componente teórica, que foi desenvolvida ao longo do Mestrado em Análises Clínicas da Universidade do Porto, mas também uma importante componente prática e laboratorial. Apesar de ser abordada nas aulas laboratoriais, é no estágio que a rotina diária de um laboratório é realmente vivida.

O estágio teve a duração de 450 horas, no Laboratório Germano de Sousa do Hospital CUF de Viseu, entre 18 de abril e 1 de agosto de 2022. Os principais setores existentes no laboratório são: Bioquímica, Imunologia, Serologia, Hematologia e Microbiologia.

Foi possível observar o dia-a-dia no laboratório, desde as colheitas até à validação dos resultados das análises clínicas. Houve oportunidade, ainda, de realizar a maioria das práticas laboratoriais da competência das Técnicas que nele trabalham, sempre com supervisão.

Abstract

The clinical analysis area has a theoretical component, that was developed through the Master of Clinical Analysis of The University of the Porto, but also has an important practical and laboratorial component. Despite it was approached in laboratory classes, it is in the internship that the daily routine of a lab is really lived.

The internship duration was 450 hours, at the Germano de Sousa Laboratory of the Viseu's CUF Hospital, between April 18th and august 1st of 2022. The most important sectors that exist in the laboratory are Biochemistry, Immunology, Serology, Hematology and Microbiology.

It was possible to observe the day-to-day in the laboratory, from the collections to the validation of the results of clinical analysis. There was also the opportunity to carry out most of the laboratory practices within the competence of the Technicians who work there, always with supervision.

Índice

Índice de figuras	VI
Índice de tabelas	VII
Siglas, acrónimos e abreviaturas	VIII
Introdução	1
Caracterização do Laboratório de estágio	2
Fase pré-analítica	3
Bioquímica	4
Imunologia	6
Hematologia	11
Microbiologia	17
Conclusão	36
Referências	37

Índice de Figuras

Figura 1 – Proteinograma eletroforético de um soro normal	5
Figura 2 – Funcionamento dos testes imunocromatográficos	8
Figura 3 – Agregados plaquetários observados em esfregaço sanguíneo corado com coloração de Wright	13
Figura 4 – Visualização ao microscópio ótico do esfregaço sanguíneo	14
Figura 5 – Cascata de coagulação	16
Figura 6 – Prova de coagulase positiva e teste Pastorex também positivo	21
Figura 7 – Fotografia tirada no laboratório de estágio	26
Figura 8 – Fotografia tirada a uma placa STRB	28
Figura 9 – <i>Aspergillus fumigatus</i> observado no laboratório	31
Figura 10 – Meio COS com crescimento de várias colónias e com disco de optoquina	31
Figura 61 – Crescimento de <i>Klebsiella oxytoca</i> em meio MCK e CPSE	31
Figura 12 – Relatório emitido pelo laboratório com o resultado da expetoração	32
Figura 73 – Frascos para hemoculturas	33
Figura 14 – Lâmina com coloração de Gram, de hemocultura positiva, que revela cocos Gram-positivos. Crescimento de <i>Streptococcus pneumoniae</i> em meio COS inoculado com hemocultura positiva	34

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Parâmetros medidos no ADVIA® Centaur XP	7
Tabela 2 – Parâmetros medidos no VIDAS®	7
Tabela 3 – Provas de aglutinação e testes imunocromatográficos realizados no laboratório	9
Tabela 4 – Tipos de meios de cultura usados no laboratório e espécies para as quais são seletivos	18
Tabela 5 – Provas bioquímicas que auxiliam na identificação de bactérias	20

Siglas, Acrónimos e Abreviaturas

AEQ – Avaliação Externa da Qualidade

AgHBs – Antígeno de superfície do vírus da Hepatite B

Anti-HBs – Anticorpos contra o antígeno de superfície do vírus da Hepatite B

Anti-HCV – Anticorpos contra o vírus da Hepatite C

aPTT – Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado

BAAR – Bacilos Álcool-Ácido Resistentes

CA125 – Antígeno Cancerígeno 125

CEA – Antígeno Carcinoembrionário

CK-MB – *Creatine Kinase Myocardial Band*

CQI – Controlo de Qualidade Interno

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

EPS – Eletroforese de Proteínas Séricas

EUCAST – *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FSH – Hormona Folículo-estimulante

FT3 – Triiodotironina livre

FT4 – Tiroxina livre

HbA1c – Hemoglobina glicada

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

INR – *International Normalized Ratio*

ISE – elétrodos seletivos de iões

ISI – Índice de sensibilidade internacional

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina

NT-proBNP – Porção N-terminal do péptido natriurético tipo B

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PCT – Procalcitonina

PNAEQ – Plano Nacional de Avaliação Externa da Qualidade Laboratorial do Instituto
Ricardo Jorge

PSA – Antígeno específico da próstata

PT – Tempo de protrombina

rpm – rotações por minuto

RT-PCR – *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

SARS-CoV-2 – *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*

SEQC^{ML} – *Sociedad Española de Medicina de Laboratorio*

SGQ – Sistema de Gestão da Qualidade

T3 – Triiodotironina total

TSA – Testes de sensibilidade a antimicrobianos

TSH – Hormona Estimulante da Tireoide

UK NEQAS – *United Kingdom National External Quality Assessment Services*

VSE – Velocidade de Sedimentação Eritrocitária

βhCG – *Beta-human Chorionic Gonadotrophin*

Introdução

As análises clínicas são um meio complementar de diagnóstico de elevada importância. Auxiliam no diagnóstico de patologias, na avaliação do seu desenvolvimento, na definição do tratamento mais adequado, assim como na monitorização da terapêutica. Servem, também, como medida preventiva.

São vários os tipos de amostra que podem ser analisados: sangue, urina, fezes, expetoração, exsudados vaginais e uretrais, exsudados de feridas, pus, líquido cefalorraquidiano, líquido pleural e outros produtos biológicos. E também são vários os setores de análise: Bioquímica, Imunologia, Serologia, Hematologia, Microbiologia...

Dada a importância para a saúde que as análises clínicas têm, é importante que os profissionais da área tenham formação especializada, muita responsabilidade e espírito crítico.

Com a evolução da tecnologia, esta foi uma área que deixou de ser tão manual e onde se utilizam equipamentos cada vez mais automatizados, sensíveis e precisos. Para além de reduzir os erros humanos, reduz, também, o tempo de análise. No entanto, é necessário um sistema de qualidade rigoroso, que inclui formações para manuseamento dos equipamentos, manutenções periódicas, calibrações e controlos, quer internos quer externos, para que os resultados sejam o mais fiáveis possível.

O mestrado em Análises Clínicas da Universidade do Porto desenvolve, num primeiro momento, a parte teórica de todos os setores deste meio complementar de diagnóstico e proporciona, depois, a possibilidade de um estágio curricular, com a duração de 450 horas. Este estágio permite ao mestrando ter contato com a realidade do trabalho nesta área, assim como consolidar o aprendizado nas aulas teóricas e laboratoriais, colocando em prática e aprendendo coisas novas, também.

Caracterização do Laboratório de Estágio

O grupo Germano de Sousa é um centro de medicina laboratorial que atua em três áreas: Patologia Clínica, Anatomia Patológica e Genética e Genómica.

A sua história teve início em 1975 e tem vindo a desenvolver-se constantemente, expandindo tanto a área física de atuação, como a área profissional.

Em 2007, iniciou a sua atividade na cidade de Viseu, com a aquisição de um laboratório. Em 2016, com a abertura do Hospital CUF Viseu, o Laboratório Germano de Sousa integrou-se nesta instituição. Como o hospital tem serviço de urgência, o laboratório funciona 24 horas por dia, 7 dias por semana.

O laboratório situa-se no piso -1 do edifício. Trata-se de um espaço com uma área de receção, uma sala de pausa, uma sala de validação, uma sala de lavagem de material, uma sala de lixos para material contaminado, a sala de triagem, uma secção de microbiologia, outra de hematologia, a área de bioquímica e imunologia e outra de serologia (1).

No laboratório são realizadas análises clínicas de várias valências: Bioquímica, Imunologia, Serologia, Hematologia e Microbiologia.

Algumas análises são realizadas nos laboratórios centrais de Lisboa e do Porto, com os quais existem protocolos, para onde são enviadas alíquotas das amostras devidamente separadas e acondicionadas.

Após o processamento das amostras, os resultados são sujeitos a validação analítica e biopatológica.

A qualidade dos resultados obtidos é uma preocupação constante do laboratório. Por isso, são realizados regularmente controlos de qualidade, quer internos, quer externos.

Os Controlos de Qualidade Internos (CQI) são feitos diariamente, sendo utilizadas preparações de vários níveis e para os diversos parâmetros executados no laboratório. Algumas destas preparações comerciais integram os kits de reagentes outras têm de ser adquiridas separadamente. São feitas, também, calibrações periódicas e quando há mudança de lote de reagentes.

Relativamente aos Programas de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ), o laboratório recebe amostras “cegas”, que são processadas normalmente e os resultados são enviados para as organizações correspondentes. Posteriormente é recebido um relatório com a avaliação dos resultados obtidos, de modo a perceber se são necessárias ações corretivas ou se os mesmos são

satisfatórios. É feita, também, uma comparação com os resultados obtidos pelos outros laboratórios pertencentes ao programa, de modo a averiguar a exatidão existente. As organizações em cujos programas de AEQ o laboratório participa são: SEQC^{ML} (*Sociedad Española de Medicina de Laboratorio*), UK NEQAS (*United Kingdom National External Quality Assessment Services*) e PNAEQ (Plano Nacional de Avaliação Externa da Qualidade Laboratorial do Instituto Ricardo Jorge).

Os aparelhos automatizados sofrem manutenções periódicas efetuadas por engenheiros especializados.

A Norma ISO 9001:2015 certifica o laboratório, permitindo a adoção e manutenção de um sistema de gestão da qualidade (SGQ) que visa a melhoria contínua dos serviços prestados, de acordo com as necessidades e expectativas dos utentes.

O estágio teve a duração de 450 horas e foi feito de 18 de abril a 1 de agosto de 2022, sob a orientação do Dr. António Fernandes, Farmacêutico Especialista em Análises Clínicas e em Genética Humana e Diretor Técnico do Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa Viseu e do Laboratório do Hospital CUF Viseu. Para além do Diretor Técnico, trabalham, no laboratório, 10 Técnicas de Diagnóstico e Terapêutica e uma Técnica Superior de Saúde.

De um modo geral, foi possível observar e executar, sempre com supervisão, a maioria dos processos realizados no laboratório, desde a fase das colheitas até à validação dos resultados. A colheita propriamente dita não foi feita, mas foi observada de perto.

Fase pré-analítica

Esta é uma das fases mais importantes para as análises clínicas, pois é onde podem ocorrer mais erros que provocam alterações nos resultados. Desde a prescrição médica, a preparação do utente, a colheita propriamente dita, a identificação das amostras, até ao transporte das mesmas, são diversos os fatores a ter em conta.

As colheitas que chegam ao laboratório são feitas em vários postos de colheitas espalhados pela zona centro de Portugal. Também no hospital existem salas de colheita, que se situam no piso 0 do edifício.

Os enfermeiros do hospital fazem as colheitas das amostras dos serviços de urgência, de internamento, de cirurgia e os auxiliares entregam no laboratório. O seu processamento deve ser imediato, pois os clínicos aguardam os resultados para dar seguimento ao atendimento/tratamento do utente.

Na triagem é avaliada a conformidade de todas as amostras que chegam ao laboratório e no programa “Appolo” é dada a entrada de todos os produtos. Posteriormente, as amostras são enviadas para os respectivos setores, para serem analisadas.

As amostras são guardadas durante um determinado tempo e, depois, são descartadas em contentores de risco biológico próprios. Esta eliminação de produtos é, também, controlada pelo programa “Appolo”.

Bioquímica

Neste setor são analisados diversos parâmetros bioquímicos do sangue e alguns da urina e de outros produtos biológicos.

O soro para análise é obtido através da colheita de sangue, para um tubo sem anticoagulante, com esferas ativadoras da coagulação e gel separador. Posteriormente, e após um tempo de espera de 30 minutos para a obtenção do coágulo, o tubo é centrifugado a 3000 rotações por minuto (rpm), durante 10 minutos. Se a amostra for urina, é colhida para um frasco assético, de seguida, é vertida uma alíquota para um tubo de análise e este é centrifugado a 3000 rpm, durante 5 minutos.

Foi possível observar a chegada de uma colheita de líquido pleural do internamento. A colheita estava num frasco assético. Foi transferida uma parte para um tubo sem anticoagulante, com esferas ativadoras de coagulação e gel separador, que, posteriormente, foi centrifugado a 3000 rpm, durante 10 minutos e foram avaliados alguns parâmetros bioquímicos.

No laboratório são analisados diversos parâmetros bioquímicos, que permitem avaliar a dinâmica do organismo a nível hepático, pancreático, renal, cardiovascular, entre outros, assim como analisar alguns metabolismos e monitorizar fármacos.

Os aparelhos existentes no laboratório para as análises deste setor são:

- Dimension® RXL Max RMS Siemens;
- Dimension® RXL Max Siemens;
- MiniCap Sebia.

Sempre com supervisão, foi possível: programar e analisar controlos diários e calibrações, quando necessário; fazer manutenções diárias, semanais e mensais dos Dimension®; colocar as

amostras a analisar, monitorizar o processo, e retirá-las no final; e, ainda, assistir à validação dos resultados.

Os equipamentos Dimension® RXL Max fazem as quantificações dos diversos parâmetros com base em ensaios enzimáticos, cinéticos, fotométricos e turbidimétricos. Possuem, ainda, uma unidade ISE (elétrodos seletivos de iões) para a quantificação dos eletrólitos (2).

Por não ser uma análise tão pedida, as EPS são feitas, apenas, 3 dias por semana (às segundas, quartas e sextas-feiras). Houve, também, a possibilidade de assistir ao controlo do MiniCap Sebia e realizar as respetivas manutenções.

Este equipamento permite a separação das proteínas do soro humano, através de eletroforese capilar, em regulador de alcalinidade. As proteínas são detetadas em função da sua mobilidade eletroforética, separando-se em seis frações principais, pela seguinte ordem: gama globulinas, globulinas beta-2, globulinas beta-1, globulinas alfa-2, globulinas alfa-1 e albuminas (3). Na **Figura 1**, é possível observar um proteinograma eletroforético de um soro normal.

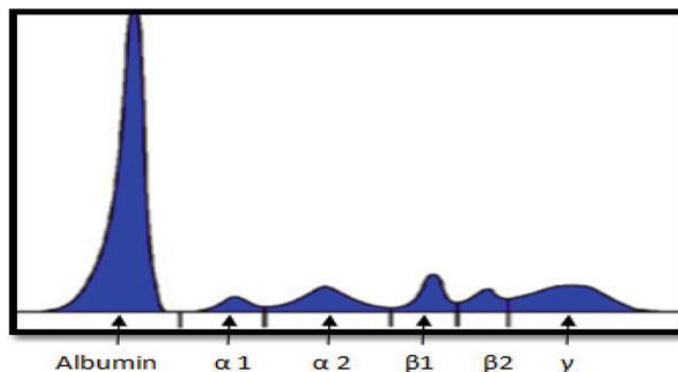


Figura 1 – Proteinograma eletroforético de um soro normal

Algumas alterações que podem aparecer nos proteinogramas, são características de alguns problemas de saúde, podendo, esta análise, auxiliar no seu diagnóstico.

Teste do suor

A fibrose quística é uma doença genética, rara e ainda sem cura que causa sintomas como tosse crónica, pneumonia de repetição, diarreia, suor mais salgado que o normal e dificuldade em ganhar peso e estatura. Considerado como exame padrão para o diagnóstico da fibrose quística, o Teste do Suor é indolor, não invasivo e pode ser realizado em qualquer fase da vida, ou seja, em bebés, crianças, adolescentes, adultos e idosos.

No laboratório, este teste tem de ser agendado com antecedência, pois o aparelho que efetua a análise, Wescor® Sweat Check™ 3120, não está sempre no laboratório e tem de ser pedido ao Porto.

O Teste do Suor é feito por meio do estímulo do suor do utente e posteriormente é realizada uma análise de condutividade, doseando o cloreto no suor (4).

Foi possível assistir ao estímulo e colheita do suor, assim como ao controlo do aparelho e posterior doseamento.

Imunologia

O principal produto biológico a analisar neste setor é o soro sanguíneo. Se as amostras tiverem sido analisadas nos equipamentos da Bioquímica, são, novamente, centrifugadas a 3000 rpm, durante 10 minutos, de modo a ficarem mais límpidas.

Marcadores tumorais, endócrinos ou hormonais, cardíacos, de doenças infecciosas, tireóides, de anemia e de sépsis são os principais parâmetros analisados em imunologia.

Os aparelhos existentes no laboratório para este setor são o ADVIA® Centaur XP e o VIDAS®. São feitas, também, algumas técnicas de serologia.

O ADVIA® Centaur XP utiliza a quimioluminescência direta, que consiste na medição da energia da luz emitida por uma reação química, combinada com a tecnologia de imunoensaio (a luz produzida tem uma relação com a quantidade de analito na amostra). O éster de acridina (EA) é o marcador quimioluminescente presente, que é oxidado pelo peróxido de hidrogénio, maximizando a emissão de luz pela alteração do ambiente de ácido para básico.

Nos imunoensaios, o antigénio é o analito que se pretende medir. Deste modo, os anticorpos são ideais, pois podem ser produzidos para se ligarem a antigénios específicos. Muitos dos ensaios deste equipamento utilizam anticorpos que se ligam covalentemente ao EA, pois esta ligação não altera a capacidade do anticorpo se ligar ao antigénio.

Utilizando PPM (partículas paramagnéticas) ligadas a anticorpos ou antigénios, que são atraídas por um campo magnético, o ADVIA® Centaur XP aplica princípios de ligação dos anticorpos do imunoensaio de vários formatos: do tipo sanduíche e competitivo (5).

Na tabela 1 estão indicados os parâmetros medidos neste aparelho, divididos pelos seus tipos.

Tabela 1 – Parâmetros medidos no ADVIA® Centaur XP

Tipo de marcadores	Parâmetros
Tumorais	CA125, CEA, PSA total e PSA livre
Tiroideios	FT3, FT4, T3, TSH, FSH
De anemia	Ferritina, Vitamina B12
Doenças infecciosas	HIV, AgHBs, Anti-HBs, Anti-HCV

A programação e análise de calibrações e controles, manutenções semanais e mensais e a colocação de amostras para análise no ADVIA® Centaur XP foi feita, sempre com supervisão. Foi possível assistir à validação de resultados.

O VIDAS® é outro equipamento existente no laboratório direcionado para o setor da imunologia. É mais utilizado para parâmetros de urgência. Usa uma tecnologia denominada ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*), que combina o método EIA (imunoenzimático) com uma leitura de fluorescência final (6).

Tabela 2 – Parâmetros medidos no VIDAS®

Tipo de marcadores	Parâmetros
Cardíacos	Troponina I, Mioglobina, NT-proBNP, CK-MB
Tromboembolismo venoso	D-dímeros
Infeção bacteriana	Procalcitonina (PCT)
Outros	Gonadotrofina coriônica humana (β hCG)

Foi possível programar a análise de amostras e colocar no aparelho, com supervisão.

A serologia é outro setor existente no laboratório, que permite a detecção de anticorpos produzidos pelo organismo contra antígenos pertencentes a agentes infecciosos.

Os testes têm a capacidade de detetar reações antígeno-anticorpo: umas detetam-se por provas de aglutinação, em que o reagente contém os antígenos específicos aos quais se vão ligar os anticorpos correspondentes, se existentes na amostra. Podem conter, também, corantes ou substâncias marcadoras para revelar a reação. O resultado é perceptível a olho nu.; outras são

detetadas por imunocromatografia ou testes de antígeno, em que os dispositivos de teste contêm uma membrana de migração com anticorpos ligados a partículas que vão dar cor e com uma linha de teste com um segundo tipo de anticorpos fixos, que se ligam ao complexo antígeno + anticorpo ligado a partículas que vão dar cor. A membrana tem, ainda, uma linha de controlo, com anticorpos específicos para os anticorpos ligados às partículas que vão dar cor. Assim, esta zona tem sempre de apresentar cor, pois significa que o teste está a funcionar corretamente. A Figura 2 ilustra o funcionamento dos testes imunocromatográficos, descrito anteriormente.

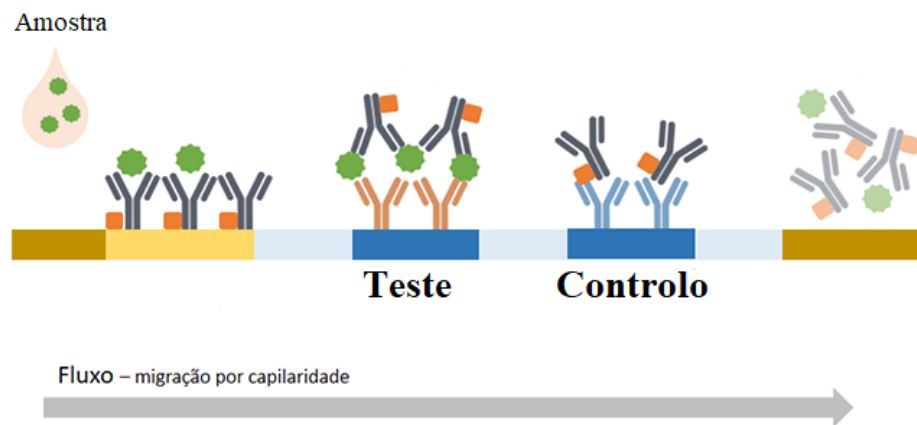


Figura 8 - Funcionamento dos testes imunocromatográficos. Os antígenos presentes na amostra ligam-se aos anticorpos marcados com as partículas que dão cor; o complexo formado vai ligar-se aos anticorpos específicos da zona de teste; aos anticorpos da zona de controlo vão-se ligar os anticorpos marcados com as partículas que dão cor que não se ligaram ao antígeno. (Adaptado de Câmara, Brunno. Disponível: <<https://www.biomedicinapadrao.com.br/2012/06/imunocromatografia.html>>. Acesso em 5 de agosto de 2022).

Na tabela 3 encontram-se as provas de aglutinação e alguns dos testes imunocromatográficos realizados no laboratório.

Tabela 3 – Provas de aglutinação e testes imunocromatográficos realizados no laboratório

Provas de aglutinação	Reação de Paul-Burnell	Deteção qualitativa de anticorpos heterófilos ou de Paul-Burnell, desenvolvidos pelo paciente após contato com o vírus de Epstein-Barr, contraindo mononucleose infecciosa.
	Rosa de Bengala	Deteção qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos associados a infecções por Brucella.
	Reação de Widal	Determinação de anticorpos associados à salmonella para Typhi AO.
	Reação de Weill-Felix	Determinação de anticorpos associados à infecção por Rickettsia que aglutinam com antígenos existentes na bactéria Proteus.
	VDRL	Deteção qualitativa e quantitativa de anticorpos associados à infecção Syphilis (método não treponémico).
	TPHA	Deteção qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos anti-treponémicos específicos existentes no soro e plasma humano com infecção por Treponema pallidum.
Provas imunocromatográficas	Malária	Deteção qualitativa de antígenos específicos da espécie <i>Plasmodium</i> , no soro humano infetado com malária.
	Que não utilizam o soro como amostra:	
	Strep A	Deteção qualitativa e presuntiva de antígenos de <i>Streptococcus</i> do Grupo A, a partir de exsudados nasofaríngeos.
	Gripe A e B	Deteção qualitativa de antígenos do vírus <i>Influenza</i> dos tipos A e B (em bandas separadas), a partir de secreções nasofaríngeas.
	RSV	Deteção qualitativa de antígenos do Vírus Sincicial Respiratório (RSV) em secreções nasofaríngeas.
	Covid-19	Deteção qualitativa de antígenos de SARS-CoV-2 em amostras nasofaríngeas.

Foi possível a realização de várias provas de aglutinação, assim como de testes imunocromatográficos, sempre com supervisão.

Covid-19

A pandemia Covid-19 foi um grande desafio para os laboratórios de análises clínicas, pois foi necessário dar resposta, em curtos intervalos de tempo, a grandes volumes de testes, quer de antígeno, quer de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), reação em cadeia de polimerase.

A técnica de PCR permite a amplificação e deteção de fragmentos de DNA, neste caso, de SARS-CoV-2.

No laboratório Germano de Sousa, os testes de PCR são, normalmente, enviados para o laboratório central de Lisboa. No entanto, para o serviço de urgência, como é necessária alguma brevidade na obtenção dos resultados para internamentos ou cirurgias, o laboratório possui um equipamento, o GeneXpert® da Cepheid, que permite testar a amostra em, aproximadamente, uma hora.

Este equipamento utiliza a tecnologia de real time RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) para três genes alvo, bastando colocar a amostra (exsudado nasofaríngeo) no cartucho apropriado. O Sistema GeneXpert® integra e automatiza totalmente a extração, a amplificação e a deteção da amostra, tudo no cartucho (7).

Foi possível observar a colheita, a preparação e a análise dos resultados da amostra.

Gasimetria arterial

A gasimetria arterial é uma análise que avalia os níveis de oxigénio e dióxido de carbono no sangue, assim como o equilíbrio ácido-base. Esta análise é habitualmente realizada através da punção da artéria radial, localizada junto ao pulso, feita pelos médicos. O objetivo é a recolha do sangue arterial que, por ser mais rico em oxigénio, permite avaliar se as trocas gasosas ocorridas a nível pulmonar estão a decorrer de forma eficaz. Esta análise avalia o pH do sangue, a pressão parcial de oxigénio (pO_2), a pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2), o equilíbrio ácido/base (ião HCO_3^-) e a saturação de oxigénio ($SatO_2$).

É um pedido frequente da urgência e, no laboratório, o aparelho responsável pela sua análise é o epoc®, um equipamento pequeno, composto por três partes: o epoc reader, o epoc host e o cartão de teste epoc. Faz-se a ligação entre o reader e o host, depois introduz-se o cartão de teste no reader, aguarda-se que seja feita uma calibração e injeta-se a amostra no local próprio do cartão de teste. Aguarda-se pelos resultados.

Os três tipos de medições de sensor utilizados no Cartão de Teste epoc são: potenciométricas, amperométricas e condutométricas (8,9,10).

Foi possível observar as técnicas da urgência a processar diversas gasimetrias arteriais.

Hematologia

Esta é a área das análises clínicas que estuda o sangue: faz a contagem e avaliação das células sanguíneas, quanto à morfologia e percentagem relativa; permite verificar o funcionamento dos órgãos hematopoiéticos e detetar/monitorizar as doenças subjacentes; e ainda estuda a hemóstase, ajudando na monitorização da terapêutica de doentes hipocoagulados, por exemplo.

O sangue é constituído, em cerca de 45% do seu volume, por glóbulos vermelhos (eritrócitos), glóbulos brancos (leucócitos) e plaquetas, que são os elementos figurados. Os outros 55% do volume correspondem ao plasma, que é constituído maioritariamente por água e também por componentes orgânicos, como proteínas, ácidos gordos, glucose... e por componentes inorgânicos, como cloro, potássio, sódio, fósforo...

As análises realizadas no laboratório são: hemograma, quantificação de reticulócitos, determinação da velocidade de sedimentação eritrocitária (VSE), determinação da hemoglobina glicada (HbA1c) e determinação de parâmetros de coagulação (hemóstase), como o INR/PT, aPTT e D-Dímeros. As amostras a utilizar nestas determinações são de sangue total, portanto, as colheitas são feitas para tubos com anticoagulante (EDTA e Citrato).

Hemograma

O hemograma é a análise que faz a contagem de plaquetas, eritrócitos e índices eritrocitários, leucócitos e contagem diferencial dos mesmos. Faz, também, o estudo da morfologia dos constituintes sanguíneos, que pode ser uma ferramenta muito importante no diagnóstico e evolução de doenças hematológicas. A amostra usada no hemograma é o sangue total, colhido num tubo com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) sódico ou potássico. Este anticoagulante impede a coagulação dos componentes celulares, a agregação plaquetária e alterações morfológicas, uma vez que faz a quelação de iões, entre eles o cálcio, Ca^{2+} . Tal como todas as amostras, estas também devem ser processadas o mais rápido possível, depois de devidamente homogeneizadas.

Os equipamentos utilizados na determinação do hemograma e na contagem de reticulócitos são o Sysmex XN-1000 e o Sysmex XN-550. O primeiro é mais utilizado para as amostras da urgência e para a contagem de reticulócitos, o outro para as amostras da rotina e para outros fluídos corporais.

A tecnologia utilizada é a citometria de fluxo fluorescente com laser semiconductor e foco hidrodinâmico. Esta tecnologia faz com que haja maior sensibilidade na diferenciação entre classes celulares sanguíneas normais e anormais. Realizam a contagem de leucócitos, plaquetas e

eritrócitos no sangue total e em líquidos biológicos, como líquido cefalorraquidiano, sinovial e serosos. O hematócrito (HCT) é calculado através do método de detecção de altura de impulso de eritrócitos. A marcação por fluorescência revela a relação núcleo-citoplasma em cada célula corada individualmente, permitindo diferenciar seis populações de leucócitos. A combinação da dispersão lateral de luz (complexidade celular), da dispersão frontal (volume celular) e da fluorescência (quantidade de material genético – DNA/RNA) diferencia as classes leucocitárias. Esta análise tridimensional dos leucócitos fornece resultados exatos e precisos.

Para calcular a concentração de hemoglobina é usado o método SLS. Neste método a amostra é diluída com o reagente de lise, Lauril Sulfato de Sódio (SLS), livre de cianeto. A cadeia globina da molécula de hemoglobina é alterada, por ação do grupo alquilo hidrofóbico do lauril sulfato de sódio, que induz a conversão do átomo de ferro presente no grupo heme, do estado ferroso (Fe^{2+}) ao estado férrico (Fe^{3+}) formando metemoglobina. Posteriormente, os grupos hidrofílicos do SLS vão-se ligar à metemoglobina anteriormente formada, dando origem a um complexo SLS-HB. Este complexo colorido é medido espectrofotometricamente e a absorvância é proporcional à concentração de hemoglobina presente na amostra (11,12).

As constantes dos eritrócitos (volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média) são calculadas a partir de RBC (eritrócitos), HGB (hemoglobina) e HCT (hematócrito):

$$\text{MCV (fl)} = \frac{\text{HCT (\%)}}{\text{RBC (x } 10^6/\mu\text{l)}} \times 10$$

$$\text{MCH (pg)} = \frac{\text{HGB (g/dl)}}{\text{RBC (x } 10^6/\mu\text{l)}} \times 10$$

$$\text{MCHC (g/dl)} = \frac{\text{HGB (g/dl)}}{\text{HCT (\%)}} \times 100$$

Foi possível fazer controlos dos equipamentos, assim como as suas manutenções e colocar as amostras a analisar.

Apesar dos equipamentos estarem cada vez mais sofisticados, os esfregaços sanguíneos periféricos (ESP) continuam a ser efetuados, embora em menor número. São realizados sempre que é prescrito pelo clínico, quando existem valores críticos/anormais no hemograma, ou histórico clínico do paciente. É importante visualizar os histogramas e estar atento a possíveis alarmes que o equipamento possa emitir.

É feito, então, o esfregaço sanguíneo. Depois de secar, é feita a **coloração de Wright**. Esta coloração utiliza a combinação de corante ácido (eosina) e o corante básico (azul de metileno) para

a diferenciação de tipos celulares. Procede-se, então, à visualização ao microscópio ótico. É, assim, possível observar agregados plaquetários (Figura 3), parasitas (foi possível observar *Plasmodium*, no laboratório) e eritrócitos. Na objetiva de 100x (imersão em óleo) é possível fazer uma contagem diferencial de leucócitos, na qual se contam 100 leucócitos consecutivos e se fazem as percentagens de cada classe, verificar anomalias morfológicas dos leucócitos, eritrócitos e plaquetas e deve ter-se especial atenção à presença de células imaturas.

No laboratório, foi possível fazer os esfregaços, fazer a sua coloração e observação ao microscópio ótico. Foi possível fazer a contagem celular, tanto em esfregaços normais como em esfregaços com alterações.

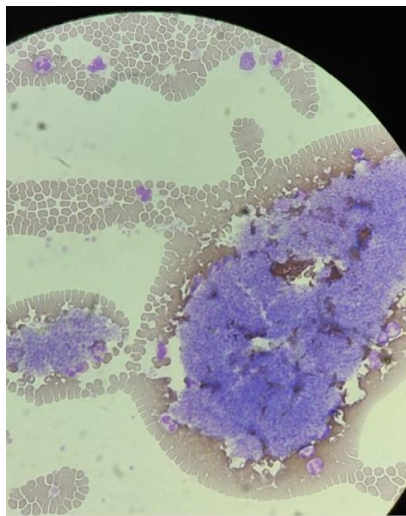


Figura 9 – Agregados plaquetários observados em esfregaço sanguíneo corado com coloração de Wright.

Caso clínico 1

Utente do sexo feminino, com 73 anos de idade. Leucocitose e linfocitose confirmadas em esfregaço de sangue periférico, com linfócitos maioritariamente pequenos e com morfologia madura. Frequentes manchas de Gumprecht (Figura 4). Estas alterações são características de leucemia linfocítica crónica.

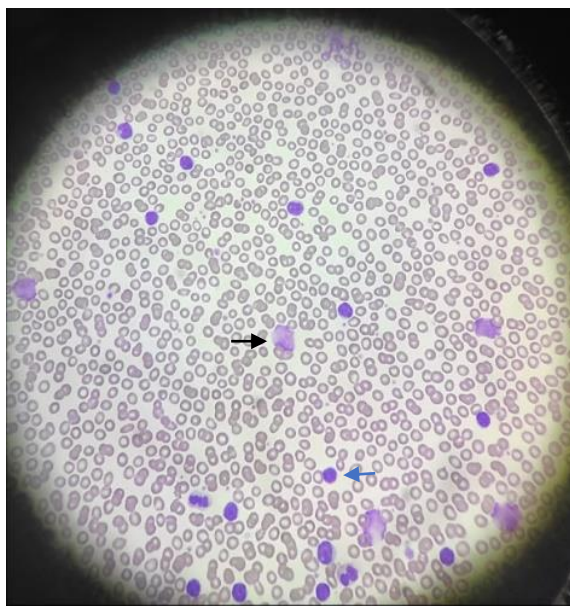


Figura 10 – Visualização ao microscópio ótico do esfregaço sanguíneo. Manchas de Grumprecht (seta preta) e linfócitos (seta azul)

Velocidade de sedimentação (VS)

A velocidade de sedimentação eritrocitária é a velocidade com que os eritrócitos sedimentam numa suspensão de plasma, na ausência de vibração e à temperatura ambiente, durante 60 minutos. É um marcador de inflamação inespecífico, uma vez que a sua alteração pode verificar-se em diversas patologias, e varia, também, com a idade, sexo, raça e, ainda, na gravidez. É impossível fazer um diagnóstico baseado apenas neste parâmetro. Contudo, torna-se numa análise complementar, que pode apresentar valores aumentados em casos de artrite reumatóide, doenças inflamatórias agudas e crónicas, mieloma múltiplo, hipertireoidismo, linfoma de Hodgkin, etc.. Pelo contrário, verifica-se diminuição da velocidade de sedimentação em casos de insuficiência hepática e carcinomas.

No laboratório, o equipamento que faz esta leitura é o VES-MATIC Cube 30, que efetua a análise das amostras, diretamente nos tubos de colheita utilizados no laboratório, neste caso, os tubos de EDTA, em apenas, 33 minutos. Assim, o sangue é cuidadosamente misturado pelo dispositivo e, depois, as amostras ficam em repouso por um tempo predefinido, para que se verifique a sedimentação. Através do grupo ótico-eletrónico, o dispositivo determina, automaticamente, o nível de sedimentação dos eritrócitos. Os dados são elaborados e automaticamente impressos e visualizados no ecrã (13).

Por vezes, torna-se necessário utilizar a técnica de Westergren manual, pois o equipamento não consegue fazer uma leitura correta, os valores são muito altos ou muito baixos, ou o volume da

amostra é muito reduzido. É introduzida a pipeta de Westergren dentro do tubo da amostra, na vertical, e preenchida até à marca zero. Passados 60 minutos, é lido o resultado.

A programação dos controlos e das amostras foi feita, assim como as manutenções do equipamento. Tudo supervisionado.

Hemoglobina glicosilada ou glicada

A hemoglobina glicosilada (HbA1c) é de especial interesse clínico na diabetes mellitus. A sua medição é um meio clínico útil para avaliar o controlo glicémico em diabéticos e também já é utilizada para o diagnóstico desta doença. Os valores da HbA1c refletem os níveis de glicose no sangue, durante a meia-vida circulatória do eritrócito (cerca de 60 dias) e estão correlacionados significativamente com os níveis de glicose no sangue, durante esse período. Fatores como dieta, exercício, regime de insulina e stress podem afetar os valores da HbA1c. Em diabéticos não controlados ou mal controlados, os valores de hemoglobina glicosilada podem ser duas ou três vezes superiores aos dos não diabéticos, enquanto os diabéticos meticolosamente controlados podem ter valores da HbA1c dentro, ou quase dentro, dos valores normais. A manutenção de um bom controlo glicémico tem um impacto positivo no desenvolvimento de complicações de longo prazo associadas à diabetes (14).

O equipamento utilizado no laboratório para medir a HbA1c é o Premier Hb9210™, que recorre aos princípios da afinidade borónica e da cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) (15). Utiliza amostras em tubos de EDTA.

Neste equipamento, são feitos, diariamente, calibração e controlos. Houve oportunidade de preparar os calibradores e controlos, assim como de os programar no equipamento e colocar a fazer, tal como as amostras para análise. Todos os procedimentos com supervisão.

Hemóstase

A hemóstase é um processo fisiológico complexo, que protege o sistema vascular de uma lesão, contribuindo para parar uma hemorragia e não comprometer o normal fluxo sanguíneo. Os componentes da hemóstase são plaquetas, células endoteliais (parede do vaso) e proteínas plasmáticas (fatores de coagulação, inibidores da coagulação e sistema fibrinolítico). De um modo geral, em primeiro lugar ocorre a vasoconstrição e a formação de um trombo constituído por plaquetas; de seguida, ocorre uma série de reações em cadeia (cascata de coagulação – Figura 5), que visam a produção de fibrina para estabilizar o coágulo; quando a ferida cicatriza e o coágulo já não é necessário, ocorre a destruição do mesmo, através da fibrinólise (16).

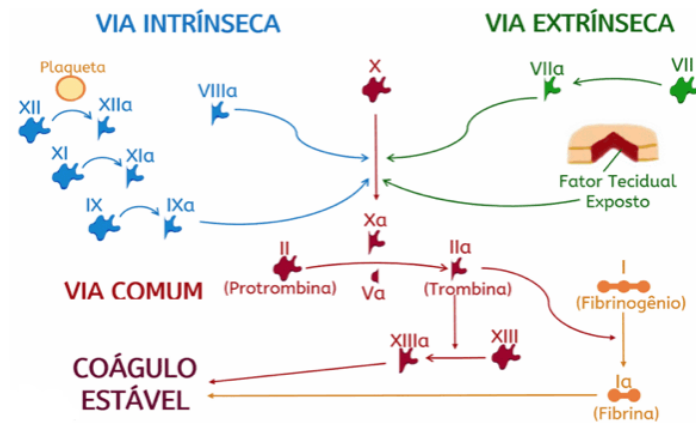


Figura 11 – Cascata de coagulação. Adaptado de: < <https://portal.wemeds.com.br/hemostasia-um-bicho-de-7-cabecas/> >

O **Tempo de Protrombina (TP)** mede o tempo de coagulação, na presença de uma concentração ótima de extrato tecidual (Tromboplastina) e cálcio, adicionados à amostra de plasma citratado. Indica a eficiência global da Via Extrínseca, avalia a hemóstase e a função hepática e ajuda na monitorização de terapêutica com anticoagulantes orais. É importante na deteção de deficiências congénitas ou adquiridas de fatores da Via Extrínseca (fator VII) e da Via Comum (fatores X, V, II e fibrinogénio).

No resultado aparece, também o valor de INR (*International Normalised Ratio*), que é a razão entre o TP do doente e o TP de controlo, elevada ao índice de sensibilidade internacional (ISI). O ISI é determinado, comparando cada reagente com a tromboplastina padrão definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS). O valor de INR é importante no controlo de doentes hipocoagulados (17).

O **Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (aPTT)** mede o tempo de coagulação do plasma, depois da ativação dos fatores de contato (sem adição do fator tecidual) e na presença dos fosfolípidos que padronizam o início da coagulação, pela rápida ativação do fator XII. Desta forma, indica, globalmente, a eficácia da Via Intrínseca (fatores XII, XI, IX, VIII) e da Via Comum (fatores X, V, II e Fibrinogénio), ajudando na deteção de deficiências congénitas ou adquiridas destas Vias. É importante, também, no controlo de terapêutica com heparina.

Existem outras análises relacionadas com a hemóstase, mas no laboratório de estágio são feitas apenas estas e os D-Dímeros, noutra equipamento.

D-Dímero é uma proteína que fica aumentada no sangue, quando ocorre a fibrinólise. É um parâmetro cujo doseamento é muito importante para despiste de Trombose Venosa Profunda (TVP) e Tromboembolismo Pulmonar (TEP) (18).

Para os estudos da coagulação a amostra de sangue é colhida para um tubo com anticoagulante Citrato de Sódio na proporção 1:9 (anticoagulante: sangue), para obtenção de plasma. Após a colheita, o tubo deve ser centrifugado a 3000 rpm, durante 15 minutos e deve ser processado o mais rápido possível para garantir a qualidade dos resultados.

O equipamento usado no laboratório é o Sysmex[®] *Automated Blood Coagulation Analyzer* da série CA-500, que utiliza o método de detecção foto-ótica de coágulos. Utilizando uma luz vermelha (660 nm) para iluminar a mistura de plasma/reagente da amostra, o dispositivo deteta as alterações na intensidade da luz dispersa devido a uma maior turvação à medida que o fibrinogénio muda para fibrina. A curva de coagulação é desenhada, tomando o tempo e a intensidade da luz dispersa como os eixos X e Y, respetivamente. O tempo de coagulação é determinado por um método de detecção de percentagens (19).

Foi possível observar o controlo do equipamento e colocar amostras a analisar, sempre com supervisão.

Microbiologia

Neste setor estão englobadas, também, a micologia, a bacteriologia e a parasitologia. E é o menos automatizado.

De um modo geral, o objetivo pretendido neste setor é verificar a existência de microrganismos responsáveis por infeções e doenças, fazendo a sua identificação para que seja administrada a terapêutica adequada (20).

Diversos tipos de amostras chegam ao laboratório: urina, fezes, expetorações, exsudados vaginais/uretrais, exsudados nasofaríngeos, exsudados de feridas, hemoculturas e outros produtos biológicos.

Algumas amostras são colhidas pelo próprio utente, devendo serem-lhe dadas instruções específicas de como proceder; a colheita deve ser feita para recipientes estéreis, devidamente identificados e depois vedados, para evitar contaminações.

Aquando da triagem, no laboratório, é feito um exame macroscópico às amostras, em que se observa a viabilidade e algumas características das mesmas: aspeto, cor, quantidade, volume, forma, turvação... Em seguimento, são feitos o exame cultural e o exame direto.

O exame cultural consiste na sementeira em meios de crescimento com características específicas para determinado tipo de microrganismos. A tabela 4 enumera os diversos tipos de meios de cultura existentes no laboratório, assim como as espécies para as quais são seletivos.

Tabela 4 – Tipos de meios de cultura usados no laboratório e espécies para as quais são seletivos

Meios de cultura	Espécies
Gelose Chocolate Haemophilus 2 (HAE2)	Seletivo para isolamento das de <i>Haemophilus</i> spp.
Gelose Chapman 2 (MSA2)	Isolamento seletivo de <i>Staphylococcus</i> spp. (<i>Staphylococcus aureus</i> forma colónias amarelas).
Gelose Mac Conkey (MCK)	Isolamento seletivo de enterobactérias e <i>Escherichia coli</i> .
Meio Lowenstein-Jensen (LJ-T)	Cultura de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e outras micobactérias.
Gelose de Chocolate PolyViteX™ VCAT3 (VCA3)	Isolamento seletivo de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Neisseria meningitidis</i> .
Caldo Selenito F (SELENITO F-T)	Caldo de enriquecimento para as <i>Salmonella</i> .
Gelose de Chocolate PolyViteX (PVX)	Crescimento de estirpes exigentes dos géneros <i>Neisseria</i> e <i>Haemophilus</i> e de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .
Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol 2 (SGC2)	Isolamento seletivo de leveduras e bolores.
Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS)	Isolamento de bactérias exigentes, como estreptococos e <i>Listeria</i> . É possível a revelação de hemólise, devido à presença de sangue e também é adequado para o isolamento de bactérias anaeróbias.
Gelose chromID® CPS® Elite (CPSE e CPSO)	Isolamento, contagem e identificação bacteriana na urina. Permite a contagem microbiana de bactérias através de métodos de inoculação padronizados, identificação direta de <i>Escherichia coli</i> e a identificação presuntiva das seguintes

	espécies bacterianas: <i>Enterococcus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Proteus</i> , <i>Providencia</i> e <i>Morganella</i> .
Gelose Hektoen (HEKT)	Isolamento seletivo de <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i> .
Gelose Campylosel (CAM)	Isolamento seletivo de <i>Campylobacter</i> .
Gelose CHROMID® Strepto B (STRB)	Meio cromogénico seletivo para o rastreio de estreptococos do grupo B (<i>S. agalactiae</i>).
Gelose Columbia ANC + 5% de sangue de carneiro (CNA)	Isolamento seletivo de bactérias Gram-positivas exigentes. Detecção de hemólises.
Caldo Todd Hewitt + Antibióticos (TODD H-T)	Caldo de enriquecimento seletivo destinado à detecção dos estreptococos do grupo B na mulher grávida. Também pode ser utilizado para o enriquecimento dos <i>S. aureus</i> no âmbito do rastreio dos <i>S. aureus</i> resistentes à meticilina (MRSA).
Caldo Coração-cérebro (BHI-T)	Crescimento de microrganismos aeróbios exigentes.

Depois de inocular a amostra no(s) meio(s) de cultura selecionados, estes têm de incubar. A incubação tem, também, algumas condições que devem ser respeitadas consoante o que é necessário para o crescimento do microrganismo em determinado meio: temperatura, tempo de incubação, humidade e atmosfera.

Quando se verifica crescimento nos meios de cultura é importante fazer a identificação da espécie do microrganismo. Em primeiro lugar faz-se a observação e contagem das colónias: cor, forma, cheiro, opacidade, alteração nos meios de cultura, elevação, hemólise, etc. Existem algumas provas bioquímicas que ajudam na identificação ou que orientam para outros tipos de estratégia de identificação. Estas provas estão descritas na tabela 5.

Tabela 5 – Provas bioquímicas que auxiliam na identificação de bactérias

Prova do Indol e TODA	As bactérias que possuem uma triptofanase, como a <i>E. coli</i> , degradam o triptofano, libertando indol. Esta reação é revelada pelo aparecimento de uma coloração azul, após ser adicionado o reagente a uma colónia colocada em papel absorvente, numa lâmina. A partir de culturas em meios que contêm triptofano, as bactérias que possuem uma triptofano desaminase (TDA) degradam o triptofano libertando ácido indol-pirúvico. Esta reação é revelada pelo aparecimento de uma coloração acastanhada, ou seja, TDA positivo como é o caso do <i>Proteus mirabilis</i> , após ser adicionado o reagente a uma colónia colocada em papel absorvente, numa lâmina.
Teste da Oxidase	Permite a deteção da enzima citocromo oxidase das bactérias. Esta enzima é característica do género <i>Neisseria</i> e da maioria das espécies de <i>Pseudomonas</i> , ambos oxidase positiva. Permite diferenciar de outros cocos negativos da família das enterobactérias, uma vez que é oxidase negativa. Na presença de oxigénio na atmosfera e de citocromo C, esta enzima oxida o reagente fenilenodiamina, para formar um composto violeta, o indofenol – oxidase positiva em 10-60 segundos. Citocromo c reduzido → Citocromo c oxidado
Teste da Catalase	Diferencia <i>Staphylococcus</i> spp. (catalase positiva) de <i>Streptococcus</i> spp. (catalase negativa). Adicionar gotas de peróxido de hidrogénio (H ₂ O ₂) a uma colónia bacteriana e observar se há ou não libertação de oxigénio (O ₂). H ₂ O ₂ → H ₂ O + O ₂ Na catalase positiva há libertação de oxigénio (O ₂) na forma de pequenas bolhas.
Teste com optoquina	A espécie <i>Streptococcus pneumoniae</i> é geralmente sensível à optoquina (aparecimento de halo de inibição), o que o distingue dos outros estreptococos α-hemolíticos.
Teste da Coagulase	Distingue <i>Staphylococcus aureus</i> (coagulase positiva) de outros <i>Staphylococcus</i> spp. (coagulase negativa). Adiciona-se uma colónia das bactérias em estudo a plasma em citrato. Os resultados são obtidos após 4 horas de incubação a 37°C. Se houver formação de coágulo é coagulase positiva.
Teste Pastorex™ Staph-plus	Esta é uma prova de aglutinação, constituída por latex sensibilizado por IgG (imunoglobulina G) e fibrinogénio, que detetam o fator de afinidade por proteína A e fibrinogénio, característicos do <i>Staphylococcus aureus</i> .

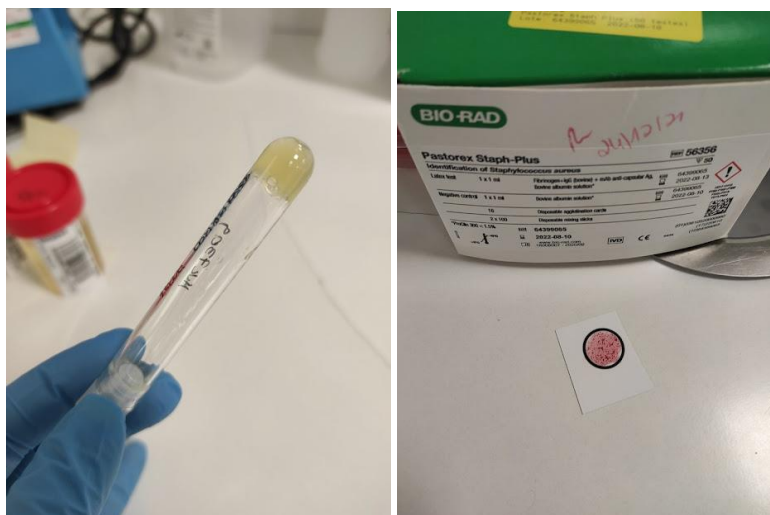


Figura 6 – Prova de coagulase positiva e teste Pastorex também positivo

A observação ao microscópio, das bactérias, é, também, importante para a sua identificação e para continuidade de escolha de estratégias rumo à identificação. Essa observação pode ser feita de várias formas: preparações a fresco, preparações coradas pela coloração de *Wright* (já descrita anteriormente), pela coloração de Gram e pela coloração de *Ziehl-Neelsen*.

A coloração das bactérias é importante, pois são difíceis de observar ao microscópio devido à ausência de cor das mesmas, uma vez que o seu protoplasma é pouco refringente.

A **coloração de Gram** é uma técnica de coloração muito importante na microbiologia, que permite, de forma rápida e simples, conhecer a forma das bactérias e, dependendo da cor com que ficam, saber se são bactérias de Gram-negativo ou Gram-positivo. Estas informações são úteis para saber que outras estratégias se devem adotar para identificar a bactéria.

O princípio básico da coloração de Gram envolve a capacidade da parede celular bacteriana de reter o corante cristal violeta durante o tratamento com solvente. Microorganismos Gram-positivos têm maior teor de peptidoglicanos na parede celular, enquanto organismos Gram-negativos têm maior quantidade de lípidos.

O primeiro passo na coloração de Gram é o uso do corante cristal violeta. O passo seguinte, também conhecido como fixação do corante, envolve o uso de lugol para formar o complexo cristal violeta-iodo para evitar a fácil remoção do corante. Depois, um solvente de etanol e acetona é usado para remover o corante.

Inicialmente, todas as bactérias absorvem o corante cristal violeta; no entanto, com o uso do solvente, a camada lipídica dos organismos Gram-negativos é dissolvida. Com esta dissolução, eles perdem a coloração primária. Em contraste, o solvente desidrata as paredes das células Gram-

positivas, fechando os poros, impedindo a difusão do complexo violeta-iodo e, assim, as bactérias permanecem coradas de violeta. A duração da descoloração é um passo crítico na coloração de Gram, pois a exposição prolongada a um agente descolorante pode remover todas as manchas de ambos os tipos de bactérias. O passo final na coloração de Gram é o uso da coloração de fucsina básica, para dar cor rosa às bactérias Gram-negativas, para facilitar a sua identificação (21,22).

A **coloração de Ziehl-Neelsen** permite a coloração de bactérias álcool-ácido resistentes, como as micobactérias, que apresentam uma grande quantidade de lípidos nas suas paredes celulares, tornando-se muito hidrofóbicas e pouco permeáveis, o que lhes confere uma grande resistência a antibióticos e à descoloração descrita a seguir. Quando se adiciona o corante de Fucsina em Fenol, aquecendo-o até libertar vapores, as micobactérias coram-se de vermelho. Essa coloração resiste à descoloração com uma solução de Álcool e Ácido Sulfúrico a 25%. Por esse motivo, são conhecidas como Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (BAAR). As outras bactérias, que não possuem as paredes celulares ricas em lípidos e coram de azul, pela coloração com Azul de Metileno, na fase final (23).

Estas técnicas, que ajudam na identificação de alguns microrganismos, também dão informações importantes para os diferentes caminhos para a identificação que se devem seguir. Um exemplo disso é a escolha das cartas de teste identificação (ID) e de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) a utilizar no VITEK[®] 2 *Compact*, o equipamento existente no laboratório.

O sistema VITEK[®] 2 é utilizado na identificação automatizada da maior parte dos microrganismos aeróbios e anaeróbios de relevância clínica e espécies *Corynebacterium*, bacilos fermentadores e não fermentadores Gram-negativos, microrganismos Gram-positivos, microrganismos fastidiosos e leveduras e microrganismos similares. É, igualmente, utilizado nos testes automatizados, quantitativos ou qualitativos, da sensibilidade aos antibióticos, de colónias isoladas da maior parte dos bacilos aeróbios Gram-negativos de relevância clínica, *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. e leveduras.

São, então, feitas suspensões bacterianas de determinadas concentrações, com culturas puras, em solução salina, que, depois, vão encher os poços de teste das diferentes cartas: umas para identificação de Gram-negativos, outras para identificação de Gram-positivos; umas para determinar sensibilidades de Gram-positivos, outras para determinar sensibilidades de Gram-negativos e outras para determinar sensibilidades de espécies específicas. As cartas de identificação baseiam-se em métodos bioquímicos e em substratos desenvolvidos, que medem a utilização da fonte de carbono, a resistência e as atividades enzimáticas. Os testes de sensibilidade determinam, quantitativamente, a concentração mínima inibitória (CMI), isto é, a concentração de um agente antibiótico necessária para inibir o crescimento do microrganismo infeccioso (24). De acordo as normas EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), além da

quantitativa, também pode ser uma determinação qualitativa: dando a bactéria em causa como resistente (R), quando o antibiótico é ineficaz; intermédia (I), quando o antibiótico pode ser ativo em doses elevadas ou por maior exposição de tempo; ou suscetível (S), quando o antibiótico é eficaz (25).

No laboratório, foi possível observar e fazer todas as técnicas descritas, sempre com supervisão: foram feitas colorações, que foram observadas ao microscópio; foi feita a inoculação de vários tipos de amostra, em diversos meios; foram preparadas as suspensões de bactérias com concentrações específicas, para ser feita a identificação e TSA no Vitek, assim como a sua introdução no mesmo.

Urina

As Infecções do Trato Urinário (ITU) encontram-se entre as infeções mais habituais em ambiente clínico. A maioria destas infeções são causadas por bactérias de Gram-negativo, sendo as mais comuns a *Escherichia coli* ou as estirpes de *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, ou *Enterobacter*, mas outras espécies, como *Staphylococcus* e *Serratia*, estão a tornar-se, também, comuns. Apesar das ITU não serem habitualmente complicadas e poderem ser tratadas com antibióticos, podem ser dolorosas e recorrentes. É, por isso, importante identificar o agente patógeno envolvido para orientar corretamente a antibioterapia (26).

Urina tipo II e urocultura

As urinas em que é pedido urina tipo II e bacteriológico de urina, depois de triadas, são vertidas para tubos de fundo cónico, devidamente identificados. No laboratório, existem 2 equipamentos que fazem a leitura de alguns parâmetros bioquímicos na urina (tais como pH, densidade, presença de glucose, proteínas, cetonas, urobilinogénio, nitritos, bilirrubinas, sangue e leucócitos) e a contagem de algumas células: são o Aution MaxTM AX-4280 e o Aution JetTM AJ-4270. Eles fazem a leitura automática através das cores obtidas nas tiras Uriflet.

Depois disto, as urinas são centrifugadas a 1500 rpm, durante 5 minutos e o sedimento é observado ao microscópio. Nesta observação são feitas as contagens de células epiteliais, de leucócitos, de eritrócitos e de cilindros e é verificada a existência de cristais (de ácido úrico, de oxalato de cálcio, de uratos amorfos, etc.), de bactérias e de elementos leveduriformes.

As urinas com pedido de urocultura são semeadas em Gelose chromID[®] CPS[®] Elite (CPSE e CPSO). No laboratório, as placas são divididas a meio (cada placa dá para duas amostras) e são usadas ansas de 1µL (microlitro) para inocular a urina, após a sua homogeneização. A placa é devidamente identificada e incubada na estufa, a 35 ± 2°C, durante cerca de 18 a 24 horas, em aerobiose.

A urocultura é dada como negativa se não houver crescimento microbiano ou se o crescimento for inferior a 10^5 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colónias por mililitro), salvo algumas exceções. Quando se observam 3 ou mais espécies de bactérias, a urocultura é dada como polimicrobiana e não valorizada.

A urocultura é dada como positiva e valorizável: se a contagem semi-quantitativa de colónias é superior a 10^5 UFC/mL com cultura pura ($>10^3$ para *Escherichia coli* e *Staphylococcus saprophyticus*, quando associadas a leucocitúria e quadro clínico compatível com ITU); se a contagem semi-quantitativa é $>10^3$ CFU/mL e $<10^5$ UFC/mL, mas há leucocitúria e sintomas de infeção urinária; se a contagem semi-quantitativa é $>10^5$ UFC/mL de duas espécies, em que uma delas está, claramente, em maioria e apresenta colónias isoladas, num doente com leucocitúria e quadro clínico compatível com infeção urinária; quando a amostra é obtida por punção e há crescimento de 10 ou mais bactérias por mililitro; existem outras situações cuja avaliação é feita caso a caso, de acordo com o tipo de doente.

Quando há crescimento bacteriano a valorizar, faz-se a observação das colónias. Se as colónias observadas tiverem aspeto de *E. coli*, é feito o teste do indol para confirmar. Se as colónias tiverem aspeto de *Proteus*, é feito o teste de TDA. É sempre necessário executar o Gram antes de qualquer procedimento e para saber que cartas escolher para os testes de identificação e TSA a fazer no Vitek® 2 Compact.

Foi possível fazer os passos todos para análises de urina, desde a triagem, a separação para tubos de análise, controlos de equipamentos e análise das urinas nos mesmos, centrifugação, decantação e visualização ao microscópio do sedimento, até à sementeira em meio CPSE e preparação para identificação e TSA. Tudo supervisionado.

Teste de gravidez na urina

Usando um teste imunocromatográfico, que deteta a presença da hormona gonadotrofina coriónica humana (β hCG) na urina, é possível verificar se uma mulher está ou não grávida.

Pesquisa de drogas na urina

É possível detetar a presença de drogas na urina, para aferir o seu consumo nos dias anteriores. A colheita da urina é feita na presença do técnico, para dois frascos estéreis, que são identificados e selados. O utente tem de preencher e assinar um documento de consentimento da pesquisa. Quando chegam ao laboratório, depois de triados, um dos frascos é congelado durante 3 meses, na eventualidade de ser necessária uma contraprova. O outro frasco é utilizado para a pesquisa.

São usados testes de imunocromatografia para pesquisa de: canabinóides, opiáceos, cocaína, anfetaminas, entre outros.

Fezes

O cancro colorretal é o terceiro tipo de cancro mais comum, tanto em homens como em mulheres. Numa fase inicial, este tipo de cancro não apresenta sintomas. A determinação de sangue fecal derivado de problemas gastrointestinais tem sido importante para um diagnóstico precoce deste tipo de cancro.

As infeções gastrointestinais podem dever-se a bactérias, parasitas ou vírus. Os microrganismos causadores mais comuns são *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp., *E. coli*, *Campylobacter* spp. e o parasita *Giardia lamblia*. É importante questionar o paciente, que apresente sintomas, que alimentos ingeriu nos últimos dias, se viajou para o estrangeiro e se tem histórico de infeções gastrointestinais.

A primeira abordagem, neste tipo de amostras, é o exame macroscópico, no qual é importante verificar a consistência, a cor, a presença de muco e/ou sangue ou de parasitas.

Pesquisa de sangue oculto nas fezes

O teste de pesquisa de sangue oculto nas fezes é um teste imunocromatográfico que deteta a presença de hemoglobina humana nas fezes, em apenas 10 minutos.

Pesquisa de antígeno de Rotavírus e Adenovírus

É, também, um teste imunocromatográfico que permite a pesquisa de antígenos de rotavírus e adenovírus nas fezes.

Coprocultura

A pesquisa de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. é muito comum quando há suspeita de infeção gastrointestinal. Em primeiro lugar, usa-se o caldo de enriquecimento de Selenito, colocando uma pequena porção de amostra de fezes dentro do frasco. Vai para a estufa, durante 18 a 24 horas, a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Após este tempo, faz-se a inoculação no meio gelose Hektoen e incuba durante mais 24 horas. Se houver crescimento de colónias valorizável, sobretudo *Salmonella* spp., a placa é enviada para o laboratório central para ser feita a respetiva identificação, serotipagem e TSA. Fazem-se, também, duas lâminas, uma com coloração de Wright e outra de Gram.

Pode, ainda, ser pedida a pesquisa de *Campylobacter* spp.. Neste caso, a amostra é repicada para a gelose Campylozel, após fazer suspensão em solução salina, e é incubada na estufa, durante 48 horas, em atmosfera microaerofílica (5% de oxigénio, 10% de dióxido de carbono e 85% de azoto).

Parasitológico de fezes

O exame parasitológico caracteriza-se pela pesquisa de parasitas com a observação ao microscópio de ovos, quistos ou parasitas. O utente deve ser alertado para, três dias antes da colheita, evitar ingerir substâncias gordas, sobretudo óleos laxantes e supositórios; alimentos que deixem muitos resíduos, como frutas de cutículas resistentes (tomates, pêssegos), grãos de envelope duro (ervilhas, feijão, lentilhas) e legumes secos; produtos opacos utilizados em exames radiológicos (em especial sais de bário), composições farmacêuticas com carvão vegetal e sais de magnésio e calcário, que alteraram a cor das fezes. Devem ser feitas três colheitas em três dias consecutivos, pois os parasitas podem não ser expelidos todos os dias, e devem ser conservadas num recipiente hermético a 4°C, caso não possam ser entregues de imediato no laboratório.

No laboratório, é utilizado um kit de concentração de ovos/parasitas fecais, que utiliza a técnica de sedimentação, usando formalina e acetato de etilo. Uma pequena amostra de fezes é adicionada ao tubo com formalina e feita suspensão; em seguida adiciona-se o acetato de etilo; um tubo de filtração/sedimentação é enroscado no primeiro, que é invertido, de modo que a suspensão passe através do filtro; deixar repousar à temperatura ambiente durante 5 minutos e, de seguida, centrifugar durante 10 minutos, a 1500 rpm; descartar o sobrenadante e adicionar uma gota de lugol para observar ao microscópio entre lâmina e lamela.

Durante o estágio foi possível observar quistos de *Entamoeba coli*, numa amostra de fezes, que é um protozoário comensal não patogénico (Figura 7).

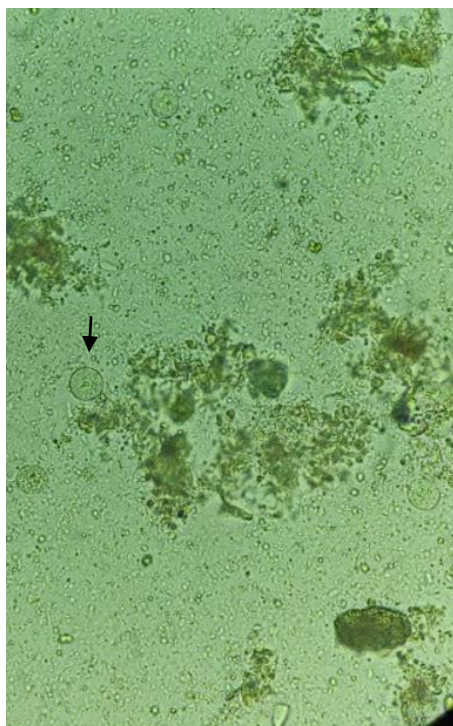


Figura 7 – Fotografia tirada no laboratório de estágio. A seta indica um quisto de *Entamoeba coli*.

Amostras do trato genital

Existem várias infecções do trato genital que podem ser comuns tanto ao homem como à mulher, tais como a gonorreia (*Neisseria gonorrhoeae*), a sífilis (*Treponema pallidum*), a clamidiose genital (*Chlamydia trachomatis*), entre outras. As vaginites (*Trichomonas vaginalis* e *Candida albicans*) e vaginoses bacterianas (*Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp., *Bacteroides* spp. e *Prevotella* spp.) são infecções, apenas, do trato genital feminino e as mais comuns no homem são a uretrite gonocócica e não-gonocócica, prostatite e ulceração do pênis.

Exsudado vaginal e uretral

Ambos são colhidos com zaragatoas com meio de transporte de Amies. Diretamente com uma das zaragatoas colhidas fazem-se três lâminas: uma para a preparação a fresco, com o objetivo de observar o movimento de *Trichomonas vaginalis*, outra com coloração de Gram, para verificar a predominância de algum tipo morfológico e a última com coloração de *Wright*, para a observação de células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, fungos, parasitas.

Os exsudados são inoculados nos meios PVX, VCA3, CNA (os vaginais também em SGC2) e incubam a 37°C, durante 48 horas. Os meios PVX e VCA3 ficam em atmosfera de dióxido de carbono (CO₂).

Pesquisa de Strepto B

As mulheres grávidas colonizadas com *Streptococcus agalactiae* (estreptococos do grupo B), a nível da vagina e do reto, têm um elevado risco de infetar o recém-nascido, durante o parto. Assim, no 3º trimestre de gravidez, entre a 34ª e 37ª semana, faz-se a colheita, com zaragatoas vaginais e anais. É usado o meio de enriquecimento Todd Hewitt que fica na estufa, durante 24 horas a 37°C. Depois, é repicado para gelose STRB que é incubada a 37°C, em atmosfera com CO₂, durante 48 horas. Crescendo uma colónia redonda, de cor rosa-pálido a vermelho, o resultado é dado como positivo para que a utente faça profilaxia (penicilina) antes do parto. Durante o estágio, foi possível observar alguns casos positivos (Figura 8).

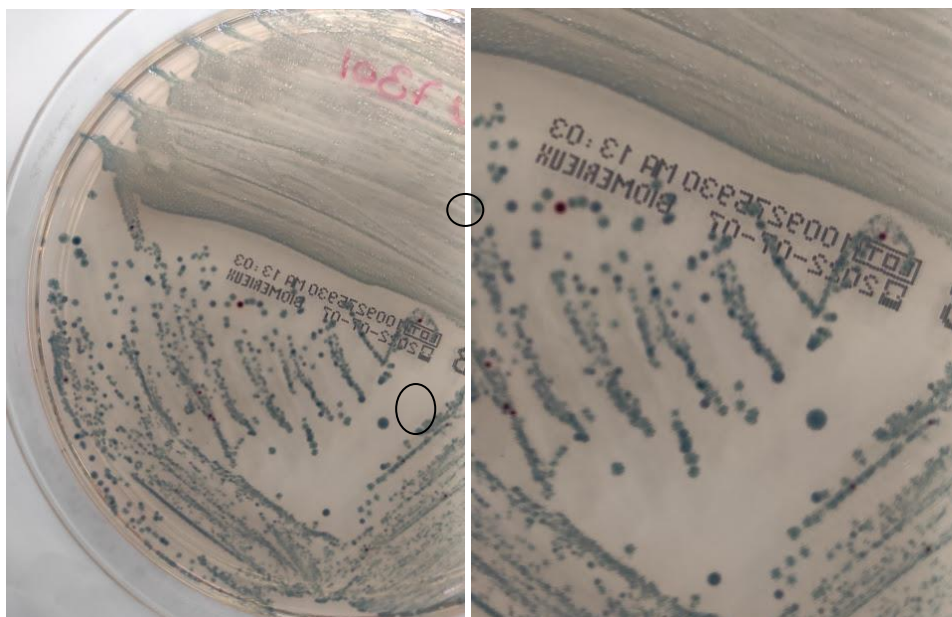


Figura 8 – Fotografia tirada a uma placa STRB, com colónias cor-de-rosa escuro (rodeadas).

Amostras do trato respiratório

O trato respiratório é composto pelo trato respiratório superior (cavidade nasal, faringe e laringe) e trato respiratório inferior (traqueia, brônquios e pulmões). Existem barreiras naturais às infeções do trato respiratório, tais como a sua anatomia, a existência de pelos nasais, a humedificação das fossas nasais e a flora normal existente na nasofaringe e na orofaringe, que dificultam a proliferação e invasão de microrganismos patogénicos. Ao contrário da maior parte das regiões do trato respiratório superior, a traqueia, brônquios e pulmões estão, normalmente, isentos de colonização por bactérias comensais e potencialmente patogénicas. No entanto, quando as defesas do indivíduo são afetadas, podem surgir infeções.

As infeções do trato respiratório inferior acontecem quando as barreiras do trato respiratório superior são ultrapassadas. A inalação de aerossóis infecciosos, tais como o bacilo da tuberculose e o da tosse convulsa, ou a aspiração de conteúdos orais/gástricos e a disseminação hematogénica são as maneiras disso acontecer. As infeções mais comuns são a bronquite ou bronquiolite, pneumonia, legionelose ou doença do legionário e empiema. Na maioria dos casos, a infeção primária é provocada por um vírus, mas, frequentemente, ocorre a infeção secundária bacteriana, provocada por um germe patogénico proveniente da nasofaringe, normalmente *Haemophilus influenzae*, mas também podem ser *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Exsudado nasofaríngeo

Uma das infecções do trato respiratório superior é a faringite. A causa mais comum é viral, no entanto, o agente etiológico mais isolado na faringite bacteriana é o estreptococo do grupo A beta hemolítico, *S. pyogenes*. O seu diagnóstico precoce e tratamento reduz a gravidade dos sintomas e a ocorrência de complicações.

No laboratório de estágio, o exame para a detecção de *Streptococcus* spp. do grupo A, é um teste rápido que se baseia no método imunocromatográfico e deteta, qualitativamente, o antígeno estreptocócico do grupo A, a partir de amostras colhidas da garganta, com zaragatoa. O resultado é obtido em apenas cinco minutos e é dado como positivo ou negativo. Este teste já foi referido na **Tabela**, assim como outros semelhantes, para detecção de antígenos de vírus (*Influenza*, Vírus Sincicial Respiratório, SARS-Cov-2), utilizando secreções nasofaríngeas.

Muitas vezes, a colheita nasal destina-se a detetar portadores sãos, pois são fontes de contágio, e não ao diagnóstico. Com a zaragatoa nasal pode ser feita a pesquisa de eosinófilos, em que é feita, apenas, uma lâmina corada com a coloração de *Wright*.

Pode fazer-se a pesquisa de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina) em que se usa o meio de cultura MSA2, com disco de cefoxitina.

O exame bacteriológico do exsudado nasofaríngeo, que é normalmente orientado para a pesquisa de *S. pyogenes*, salvo no caso de existir pedido específico para pesquisa de outro agente, consiste na inoculação em meio de cultura COS, no qual é colocado um disco de bacitracina (se houver crescimento com halo é provável que seja *S. pyogenes*) e fazem-se duas lâminas coradas com Gram e *Wright*.

Expetoração

Este é o produto biológico mais frequentemente submetido a análise bacteriológica, quando se fala de infecções do trato respiratório inferior. É importante avaliar a qualidade e quantidade do produto, uma vez que a sua colheita é difícil. A expetoração, devido a uma infecção bacteriana, é purulenta e contém material opaco, verde ou amarelo, assim como secreção mucoide. Deve ser colhida de manhã, pois é quando está mais concentrada e o indivíduo deve expetorar com tosse profunda e, caso não consiga expetorar, a amostra deve ser aspirada com a ajuda de um aparelho.

A expetoração é inoculada nos meios CNA, COS, HAE2 e MacConkey. Os meios CNA, COS e HAE2 são incubados a 37°C, durante 48 horas, em atmosfera de CO₂. Na gelose de CNA adiciona-se um disco de optoquina. A espécie *S. pneumoniae* é sensível a este antibiótico, o que o distingue dos outros estreptococos α -hemolíticos. Se houver crescimento à volta do disco é resistente e não se trata de *S. pneumoniae*, em contrapartida, se aparecer halo de inibição, é muito

provável que seja este o microrganismo responsável pela infecção. São feitas duas lâminas, uma com coloração de *Wright* e outra com coloração de Gram. Em caso de crescimento de colónias, é feita a respetiva identificação e TSA.

É feita, também, a descontaminação da expetoração, de modo a fluidificá-la e a eliminar a flora comensal, favorecendo a pesquisa de micobactérias. Para isto, é preparada uma mistura de L-cisteína, que é um agente mucolítico de ação rápida, e de cloreto de benzalcónio, que destrói a maioria dos microrganismos, exceto as micobactérias. À expetoração é adicionado igual volume desta mistura e homogeneíza-se bem. Fica à temperatura ambiente entre 15 e 45 minutos. De seguida, é adicionado e misturado o mesmo volume de tampão fosfato, que neutraliza o pH e vai a centrifugar durante 20 minutos, a 3000 rpm. O líquido sobrenadante é usado para fazer uma lâmina com coloração de *Ziehl-Neelsen* e, ao sedimento, é adicionada albumina bovina, que age como um agente protetor. Faz-se a inoculação em meio *Lowenstein-Jensen*.

Durante o estágio, houve oportunidade de fazer a descontaminação de expetorações, assim como as inoculações.

Caso clínico 2

Chegaram ao laboratório três amostras de expetoração de um utente do sexo masculino, com 73 anos de idade. Como foram entregues todas no mesmo dia e apresentavam o mesmo aspeto macroscópico, juntaram-se.

Foram feitas lâminas com coloração de Gram e de *Wright*. A expetoração foi inoculada nos meios COS (com disco de optoquina), HAE2 e MacConkey. Os meios COS e HAE2 foram incubados a 37°C, durante 48 horas, em atmosfera de CO₂. A expetoração foi descontaminada e feita a lâmina com coloração *Ziehl-Neelsen* e a inoculação em meio *Lowenstein-Jensen*.

A observação das lâminas detetou muitos leucócitos, alguns cocos, predominância de bacilos Gram-negativo e fungos, então semeou-se em SGC2 (Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol 2), onde cresceram *Aspergillus fumigatus* (Figura 9); o crescimento verificado no meio COS não foi valorizado, pois não havia um destacamento de um tipo de colónias e também não havia halo à volta do disco de optoquina (Figura 10); do meio MCK foi feita a repicagem de uma colónia para CPSE, que, após incubação, identificação e TSA, se verificou ser uma *Klebsiella oxytoca* (Figura 11).

O resultado é possível ser observado na Figura 12, positivo para *Klebsiella oxytoca*, sensível a amoxicilina/ácido clavulânico, a trimetoprim/sulfametoxazol e a ciprofloxacina.

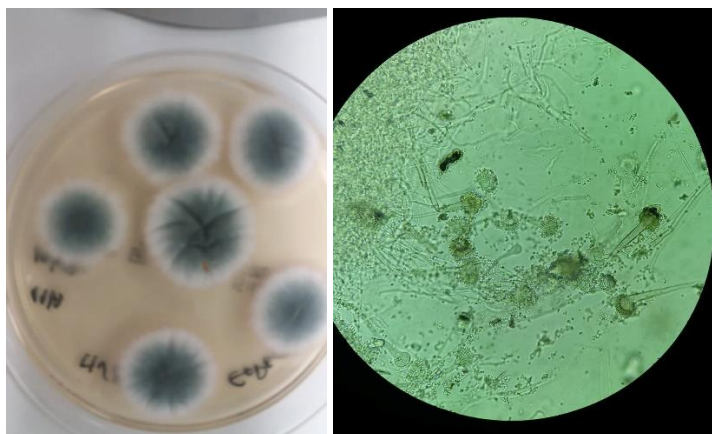


Figura 9 – *Aspergillus fumigatus* observado no laboratório. À esquerda, em meio SGC2 e à direita observado ao microscópio.



Figura 10 – Meio COS com crescimento de várias colónias e com disco de optoquina.

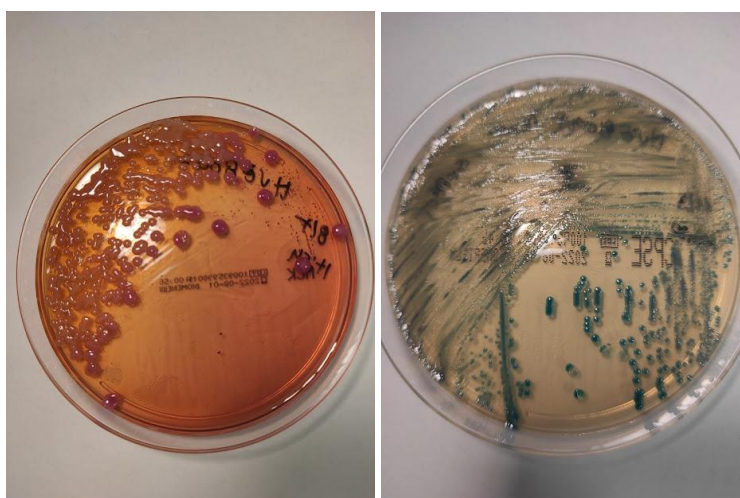


Figura 11 – Crescimento de *Klebsiella oxytoca* em meio MCK (à esquerda) e CPSE (à direita)

Processo origem: JM510947032 Nº Origem: 13441250		Exmo.(a) Senhor(a) Dr.(a): Análises de Exmo Sr. VISEU	
HOSPITAL CUF VISEU Utiliz.: JM510947032 73 A Nº Análise: 1195423 Colheita: 20-05-2022 Relatório: 20-07-2022		0 HVC-EXTERNO (HVE) PNEUMOLOGIA 1195423	
Análises	Resultados	Valores de Referência	Resultados 03-03-2022
Microbiologia EXPECTORAÇÃO (3ª Amostra) EXAME BACTERIOLÓGICO Directo Gram Ziehl-Nielsen Cultural Resultado			
		Muito abundantes PMNs; Flora abundante de Gram, com destaque para bacilos Gram negativo Não se observaram bacilos ácido-álcool resistentes Klebsiella oxytoca	
		Sensível Amoxicilina / Ac.Clavulânico, Trimetoprim/Sulfametoxazol, Ciprofloxacina	
EXAME MICROBACTERIOLÓGICO OBSERVAÇÕES:			
Cultura de fungos Positiva para Aspergillus fumigatus			
Análises em curso: BK Cultural - Expectorção (1ª Amostra) BK Cultural - Expectorção (2ª Amostra) BK Cultural - Expectorção (3ª Amostra)			

Figura 12 – Relatório emitido pelo laboratório com o resultado da expetoração. O resultado é o mesmo para as três amostras, pois foram analisadas todas juntas.

Feridas

As infeções das feridas podem ser endógenas (provocadas por microrganismos que habitam noutra região do corpo do doente) e exógenas (a fonte do microrganismo infetante é exterior ao corpo do doente). Já as infeções dos tecidos moles estão, geralmente, associadas à produção de pus e as bactérias que as provocam são designadas por piogénicas, tais como *S. aureus* e *S. pyogenes*. As amostras chegam ao laboratório em zaragatoas ou frascos/seringas com pus.

Zaragatoas de feridas

Faz-se suspensão em solução salina, lâmina com coloração de Gram e outra com coloração de Wright. A inoculação é feita em meio MCK e CNA, incubando a 37°C, durante 48 horas (CNA em atmosfera de CO₂). Quando há crescimento bacteriano no meio CNA, procede-se ao teste da catalase, para diferenciar estafilococos (catalase positiva) de estreptococos (catalase negativa) e, consoante o resultado, continua-se a identificação bacteriana e fazem-se os respetivos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos.

Pus

São feitas lâminas com coloração de Gram e de Ziehl-Neelsen e são inoculados os meios de cultura PVX, COS, MCK e caldo BHI a incubar durante 48 horas, a 37°C (PVX e COS em

atmosfera de CO₂). Se houver desenvolvimento bacteriano continuam-se os procedimentos para a identificação e respectivos TSA. Se, ao fim de 24 a 48 horas, houver crescimento no caldo BHI, que é revelado pela turvação do líquido sobrenadante, mas ausência de desenvolvimento nas placas, deve examinar-se a cultura do caldo ao microscópio e obter subculturas em aerobiose e anaerobiose.

Sangue – Hemocultura

O sangue é, normalmente, estéril. As infecções da corrente sanguínea causam a morte, por isso, a detecção de microrganismos e a sua identificação é essencial no tratamento dos doentes. Nas hemoculturas, uma amostra de sangue é incubada num meio que promove o crescimento dos microrganismos. As condições de colheita são determinantes na obtenção de resultados, pois podem ocorrer contaminações (27). No laboratório, a maioria das hemoculturas é da urgência, sendo colhida pelos enfermeiros do hospital.



Figura 13 – Frascos para hemoculturas.

Fonte: <https://enfermagemilustrada.com/2017/04/30/hemocultura-o-tecnico-de-enfermagem-pode-colher/>

Quando a amostra chega ao laboratório, é triada e os frascos são introduzidos no equipamento BD Bactec™ FX40, durante 5 dias. Este equipamento, com sistema automatizado e extremamente sensível, deteta indícios precoces de desenvolvimento bacteriano, através de fluorescência. Quando é detetada proliferação de microrganismos, a posição onde o frasco positivo está, pisca a vermelho e este deve ser retirado. Depois de homogeneizado, passa-se álcool etílico na abertura do frasco e insere-se uma agulha própria.

São feitas lâminas com coloração de Gram, para observação microscópica imediata, pois o aspeto morfológico pode orientar na escolha do antibiótico inicial. Os meios de cultura a inocular são COS e PVX, que vão para a estufa durante 48 horas, numa caixa com gerador de CO₂. Caso haja crescimento, deve-se valorizar o isolamento das estirpes, prosseguindo para a identificação e testes de suscetibilidade aos antibiogramas.

Após cinco dias, na maioria dos casos, se as hemoculturas não positivarem dá-se o resultado como negativo.

É importante referir que todas as inoculações e manuseamentos das amostras, na área da microbiologia, devem ser feitos na câmara de fluxo laminar, e o profissional deve estar devidamente equipado e com luvas.

Caso clínico 3

Menina de 2 anos, com fibrose quística. Hemocultura colhida na urgência positivou. Foi feita lâmina com coloração de Gram, que revelou a presença de cocos Gram-positivos (Figura). Esta informação foi imediatamente dada ao médico que requisitou a análise.

Foi feita a inoculação em meio COS e, após incubação em meio de CO₂, houve crescimento de colónias (Figura 14) e foi feita a identificação e respetivos TSA, revelando *Streptococcus pneumoniae*.

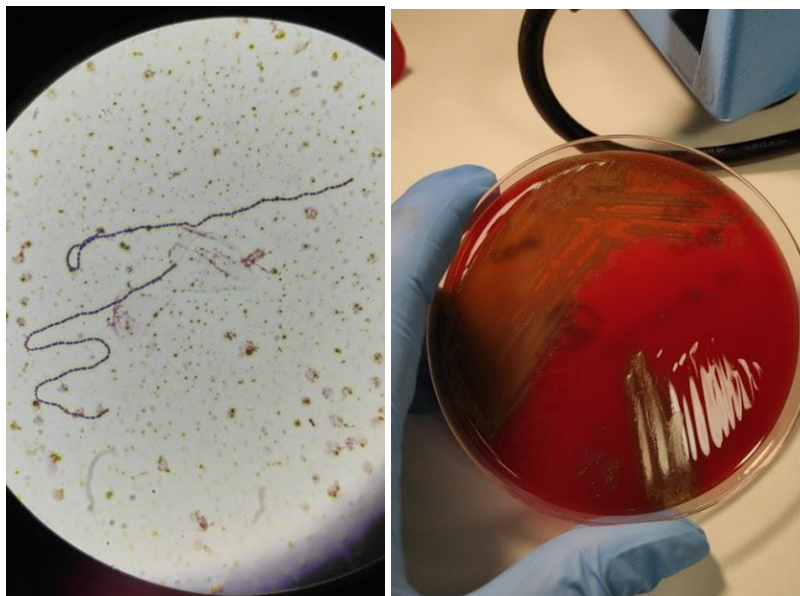


Figura 14 – Lâmina com coloração de Gram, de hemocultura positiva, que revela cocos Gram-positivos (à esquerda). Crescimento de *Streptococcus pneumoniae* em meio COS inoculado com hemocultura positiva (à direita).

É importante referir que todas as inoculações e manuseamento de amostras devem ser feitos na câmara de fluxo laminar.

No laboratório, durante o estágio, houve oportunidade de integrar todas as áreas lá existentes, assim como, observar e executar todos os procedimentos envolvidos.

Conclusão

A passagem pelo Laboratório Germano de Sousa foi muito importante. O contato com o dia-a-dia no laboratório de análises clínicas, a integração da rotina e a observação de perto de todas as técnicas efetuadas permitiu um maior entendimento e compreensão da parte teórica.

Muitas vezes, não é dado o devido valor ao trabalho realizado num laboratório de análises clínicas. A responsabilidade e o rigor que os profissionais desta área têm de ter é enorme, pois, qualquer pequeno erro pode prejudicar a saúde do utente.

Os resultados das análises clínicas devem ser interpretados por profissionais, juntamente com a avaliação de outros exames e informações clínicas do utente. Por vezes, resultados fora dos intervalos de referência, não são significativos no contexto clínico do utente e, outras vezes, é necessária confirmação com avaliação de outros parâmetros.

O estágio curricular é muito importante para um mestrando consolidar os conhecimentos adquiridos, para adquirir novos e para perceber que vai estar sempre a aprender.

Referências bibliográficas

1. Germano de Sousa - Centro de Medicina Laboratorial. Disponível: <<https://www.germanodesousa.com/>>. (Acesso em 13 de julho de 2022).
2. Manual do Utilizador. Sistema de química clínica Dimension® RxL Max®, Siemens Healthcare Diagnostics Inc. 2011/12. Disponível: <www.siemens.com/diagnosis>. (Acesso em 10 de julho de 2022).
3. Ramanathan S, Srinivas C.N, Serum Protein Electrophoresis and Its Clinical Applications. 2019. Disponível: <<https://www.intechopen.com/chapters/69537>>. (Acesso em 10 de julho de 2022).
4. Disponível: <<https://unidospelavida.org.br/testedosuorupv/>>. (Acesso em 20 de agosto de 2022).
5. Siemens. Sistema de Imunoensaios ADVIA Centaur® XP. Operador's Guide. Rev. 01, 2021-09. Disponível: <www.healthcare.siemens.com>. (Acedido 7 de agosto de 2022).
6. Manual do utilizador VIDAS®. 2019. Disponível: <www.biomerieux.com> (Acesso em 5 de junho de 2022).
7. Disponível: <<https://cepheid.widen.net/s/wjkjqf6vzv/cepheid-xpert-cov-2-plus-datasheet-a4-ce-ivd-3256-english>>. (Acesso em 13 de agosto de 2022).
8. Disponível: <<https://www.cintramedica.pt/analises-clinicas/analises-especiaisgasimetria-arterial>>. (Acesso em 16 de agosto de 2022).
9. Sistema de análise sanguínea epoc. Guia do utilizador: Funcionalidades de garantia de qualidade melhoradas para o sistema epoc. 2021. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Rev: 05.
10. Manual do sistema epoc. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Rev: 02. Disponível: <siemens-healthineers.com/epoc>. (Acesso em 4 de junho de 2022).
11. Automated Hematology Analyzer XN series (XN-1000). Instruções de Utilização. © SYSMEX CORPORATION 2017-2021. Ver. 22.
12. Automated Hematology Analyzer XN-L series XN-550/XN-450 /XN-350. Operação básica. Ver. 5.
13. Manual operativo VescubeMatic|30. Diesse. Rev. 0.01 (19/11/09) Disponível: <<https://www.diesse.it>>. (Acesso em 16 de julho de 2022).
14. Norma da Direção Geral da Saúde N.002/2011. Disponível: <<https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0022011-de-14012011-pdf.aspx>>. (Acesso em 14 de agosto de 2022).
15. A.Menarini Premier Hb9210™. Manual do utilizador. Revisão 20. 2015. Disponível: <www.menarinidiagnostics.com>. (Acesso em 16 de julho de 2022).
16. Disponível: <<https://www.siemens-healthineers.com/pt/hemostasis/what-is-hemostasis>>. (Acesso em 14 de agosto de 2022).
17. Mauro M. F. Z, Wang R, Cristóvão S. A. B, Salman A. A, Oliveira J. B, Mangione J. A. Novos Inibidores da Trombina: Qual o Estado Atual das Pesquisas? Rev Bras Cardiol Invas 2004; 12(3): 130-137
Disponível: <

- file:///C:/Users/catia/Downloads/Novos_Inibidores_da_Trombina_Qual_o_Estado_Atual_d.pdf>.
(Acesso em 14 de agosto de 2022).
18. Soeiro B, Greenfield H, Sousa S, Guedes C. D-Dímeros no Diagnóstico de Tromboembolismo Venoso num Serviço de Urgência. Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna. 2021. Disponível: < <https://revista.spmi.pt/index.php/rpmi/article/view/83/30>>. (Acesso em 14 de agosto de 2022).
 19. INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO Sistema Automático de Análise da Coagulação do Sangue série CA-500. Copyright © 2001- 2009.
 20. FONSECA, Ana Bruschy et al. - Orientações para elaboração de um manual de boas práticas em Bacteriologia. Ministério da Saúde Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge - 40. 2004).
 21. Coloração Gram: Tripathi N, Sapra A. Gram Staining. StatPearls Publishing. 2022. Disponível: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/#_NBK562156_pubdet_>. (Acesso em 15 de agosto de 2022).
 22. Disponível:<<https://docs.ufpr.br/~microgeral/arquivos/pdf/pdf/Fundamentos%202009/Coloracaodegram.pdf>>. (Acesso a 15 de agosto 2022).
 23. Disponível: < <https://www.renylab.ind.br/wp-content/uploads/2018/05/Colora%C3%A7%C3%A3o-de-Ziehl-Neelsen.pdf>>. (Acesso em 4 de agosto 2022).
 24. L'ETOILE, Marcy - BioMérieux SA. VITEK® 2 Compact. Manual do Utilizador do Aparelho. ©2015 bioMérieux. Inc. Disponível em: <www.biomerieux.pt>. (Acesso em 15 de agosto de 2022).
 25. Disponível: <<https://www.eucast.org/newsiandr>>. (Acesso em 15 de agosto de 2022).
 26. Disponível: < <https://www.biomerieux.pt/produto/chromidtm-cpsr-elite-e-outros-meios-chromidtm-para-infecoes-do-trato-urinario>>. (Acesso em 15 de agosto de 2022).
 27. Boletim CIRA. Disponível: < <https://www.chlc.min-saude.pt/wp-content/uploads/sites/3/2021/10/CIRA-Setembro.pdf>>. (Acesso em 17 de agosto de 2022).