

Diagnóstico Laboratorial: Esquema geral

Laboratory diagnosis: A general approach

Joaquim Manuel Monteiro Agostinho

Médico Veterinário. Especialista em Bacteriologia e Virologia Médicas.

RevCSE 2009; 23-32

RESUMO

Pretende-se com este trabalho apresentar a sequência de procedimentos de um diagnóstico laboratorial, principalmente microbiológico, que esclareça quem não é laboratorista, sobre os passos sequenciais para alcance de um diagnóstico fiável e o mais breve possível.

A análise sistemática deste tema abordará sequencialmente a colheita das amostras, sua observação macroscópica e microscópica, técnicas directas para detecção de antígenos e/ou anticorpos, isolamento dos agentes, identificação dos mesmos e por fim a determinação de quais os quimioterápicos adequados para o seu combate ou as suas hipotéticas resistências.

Palavras-chave: Diagnóstico; laboratório; microbiologia.

ABSTRACT

With this research we intend to present the sequence of procedures of a microbiological laboratory diagnosis that would clarify, for those who do not work at a laboratory, the sequential steps in order to reach a fast and reliable diagnosis.

The systematic analysis of this theme will focus on samples' collecting and their macroscopic and microscopic observation, on the direct techniques for the detection and identification of their antigens and antibodies, isolation of the micro-organisms, their identification and lastly, on determining which chemotherapy medicines are more suitable to structure a therapy program and to fight against hypothetical resistances.

Key-Words: Diagnosis, Laboratory, Microbiology

Introdução

O laboratório de microbiologia deve apoiar clínicos e epidemiologistas na identificação de agentes biológicos responsáveis por diferentes doenças.

O funcionamento de cada laboratório rege-se por normas e protocolos técnicos e de biossegurança contidos em manuais.

Desde a colheita do produto biológico até à identificação de um agente biológico e entrega da resposta final, existem procedimentos que

têm regras e sequências próprias e que vão ser abordadas a seguir de uma forma geral, com o objectivo de esclarecer quem não é laboratorista para uma boa colaboração com o laboratório.

Colheita de amostras

Cada tipo de amostra tem as suas particularidades de colheita, e não cabe no âmbito deste trabalho estar a descrevê-las detalhadamente. Abordaremos apenas as noções gerais e básicas para uma boa colheita.

Quantidade da Amostra

A quantidade de amostra deve ser suficiente para que se possam realizar todas as análises solicitadas pelo corpo clínico ou que constem de protocolos já aprovados.

Qualidade da Amostra

Deve ser a melhor possível, evitando ao máximo a conspurcação da mesma e outras manipulações inadequadas que impeçam o isolamento e a identificação de agentes com exigências específicas como, por exemplo, oxigenar a amostra agitando-a quando se pretende isolar um anaeróbio.

Conservação da Amostra

Ter em atenção, para cada amostra, a melhor maneira de a conservar, levando em linha de conta o agente que se pretende detectar, a temperatura (há agentes que não podem ser refrigerados outros devem-no), humidade (evitar a dessecação), luz solar (agentes que são inactivados muito rapidamente pelos raios solares), ar (os anaeróbios estritos não devem ter nenhum contacto com o ar), etc.

Envio da Amostra para o Laboratório

O transporte das amostras deve ser efectuado por pessoal ou serviços para tal capacitados, evitando-se assim as conspurcações das mesmas ou a contaminação de outrem ou do ambiente, por aqueles cumprirem com as normas de biossegurança em vigor no país e na clínica ou laboratório em questão.

Ter em consideração que o tempo que medeia entre a colheita da amostra e o seu processamento laboratorial é essencial para um diagnóstico final com qualidade. Este tempo deve ser o mais curto que for possível. Em caso de se prever alguma demora devem usar-se meios de transporte ou mecanismos de conservação adequados a cada caso (refrigeração, gelo fundente, neve carbónica, azoto líquido, etc.).

Após a chegada das amostras ao laboratório estas são registadas, processo que varia de laboratório para laboratório. De seguida são encaminhadas para processamento laboratorial, segundo normas e protocolos que variam, igualmente, de laboratório para laboratório.

Processamento Laboratorial das amostras

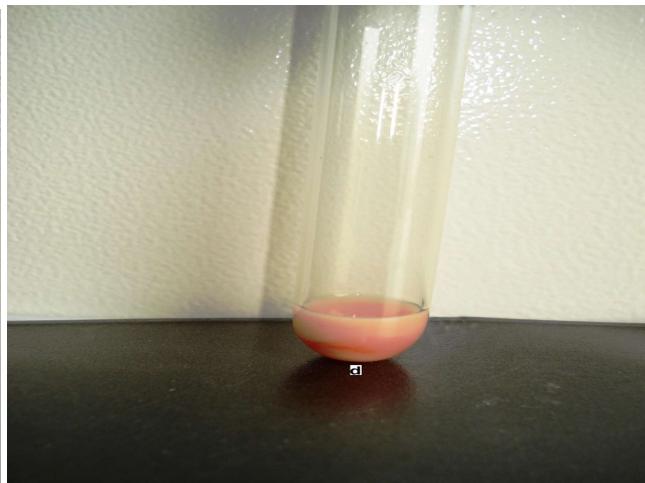
Observação Macroscópica das Amostras

Todas as amostras devem ser observadas e registado o seu aspecto macroscópico. Notar a cor, turvação, limpidez. Verificar a presença ou ausência de pus, muco ou sangue. Observar a sua consistência (sólida, pastosa, líquida).

Observação Microscópica das Amostras

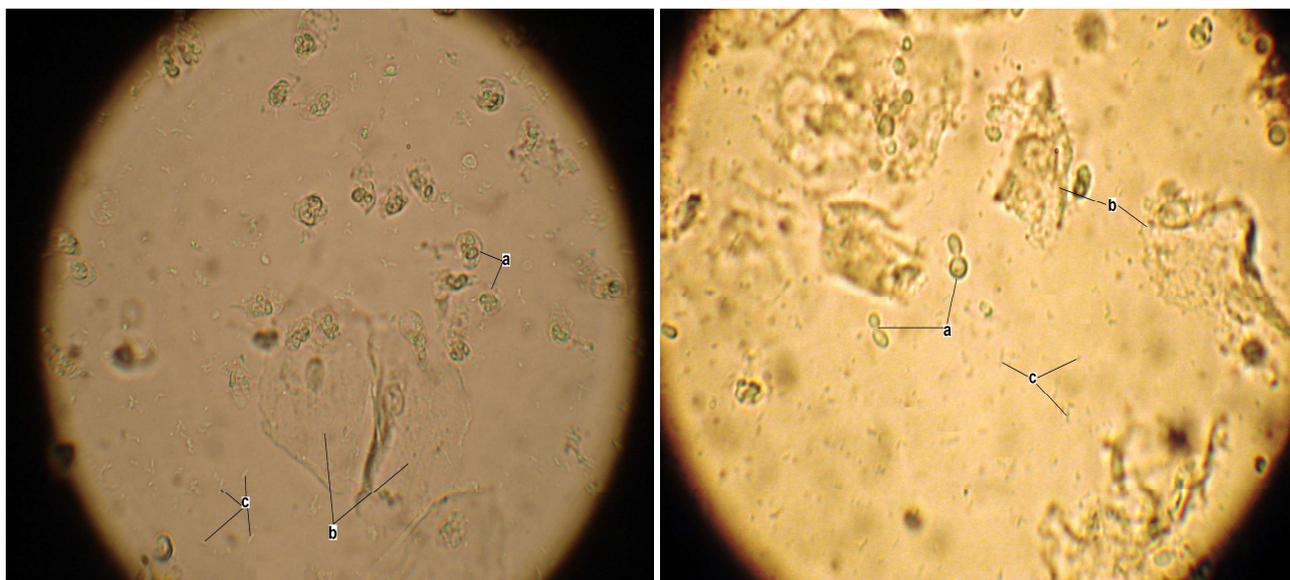
Pode ser realizada a fresco entre lâmina e lamela ou após coloração.

A fresco, dependendo da amostra, poderão ser observados os seguintes parâmetros: mobilidade, quantidade relativa de vários elementos (células, bactérias, parasitas e seus ovos, etc.), morfologia dos diferentes elementos (das células, das bactérias, dos parasitas, etc.).

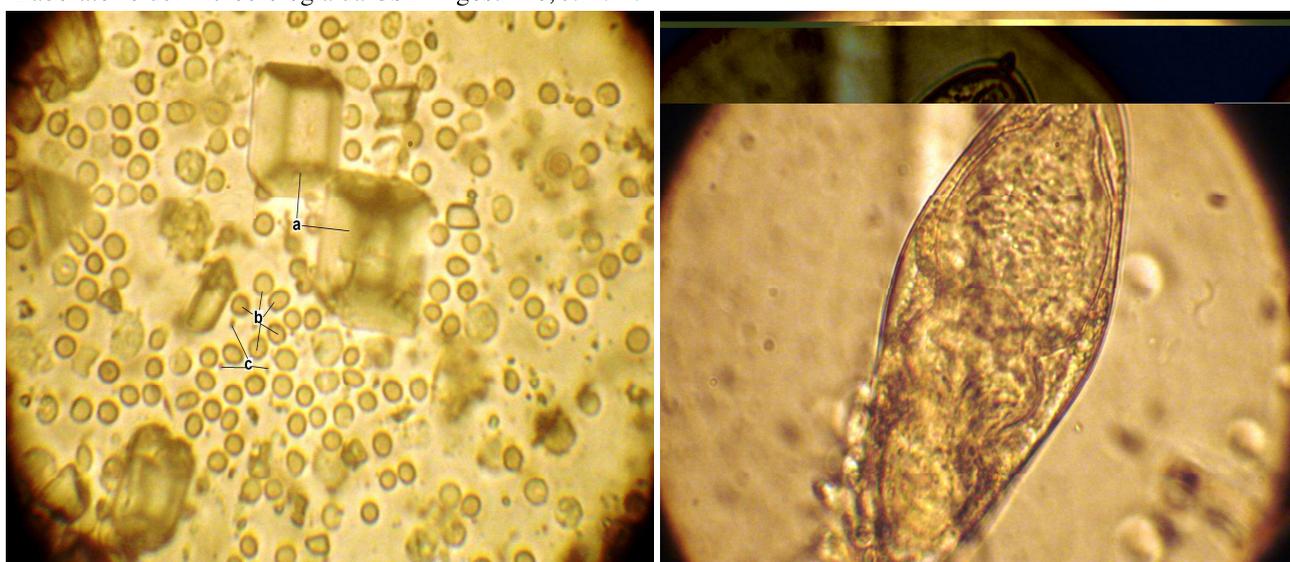


Figuras 1 e 2 – Aspecto macroscópico das amostras: a– Urina turva; b– Urina sanguinolenta; c– Urina límpida; d– Pus sanguinolento.

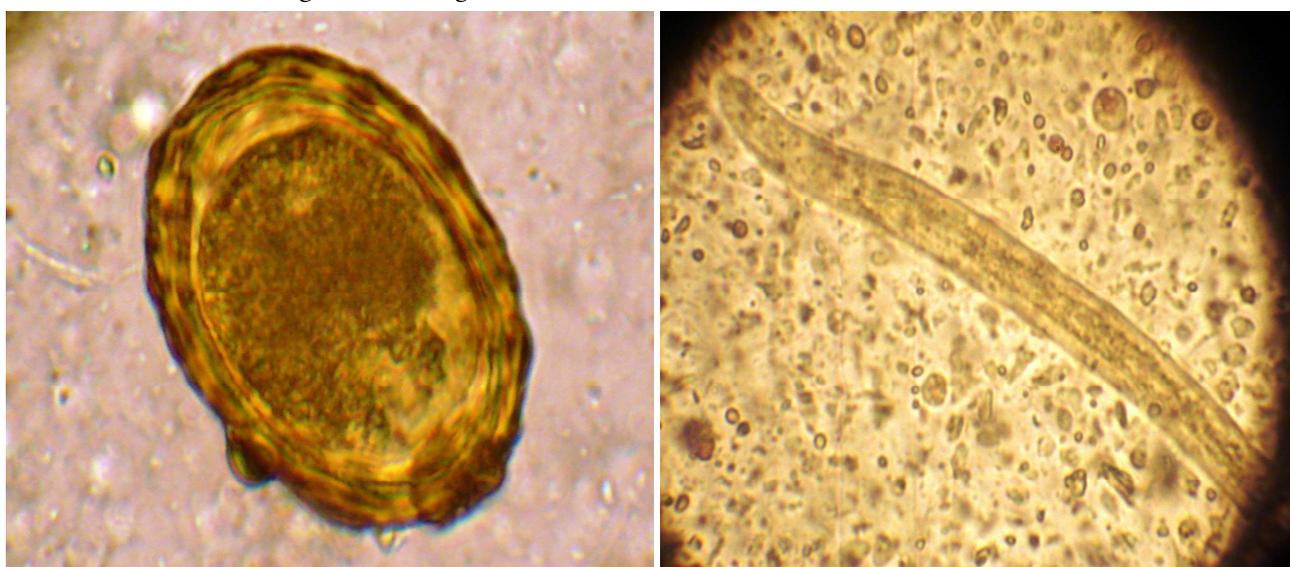
Laboratório de Microbiologia da CSE- Agostinho, J.M.M.



Figuras 3 e 4– Exames a fresco de Exsudato vaginal: a– Leucócitos; b– Células epiteliais; c– Bactérias (à esquerda); e a- Fungos leveduriformes; b-Células epiteliais; c– Bactérias (à direita)
Laboratório de Microbiologia da CSE- Agostinho, J.M.M.

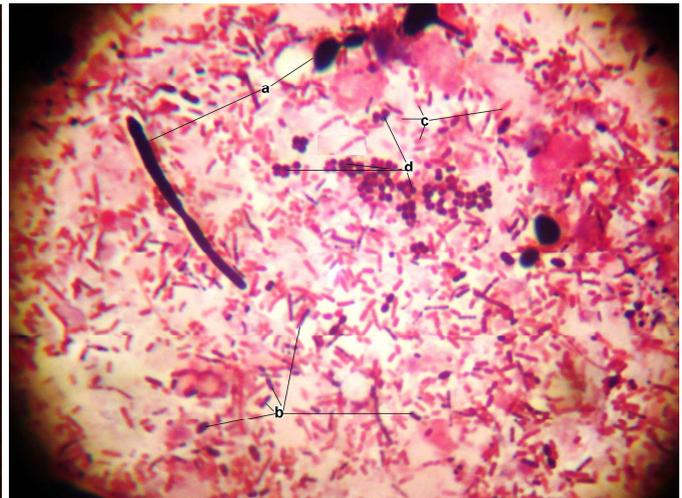
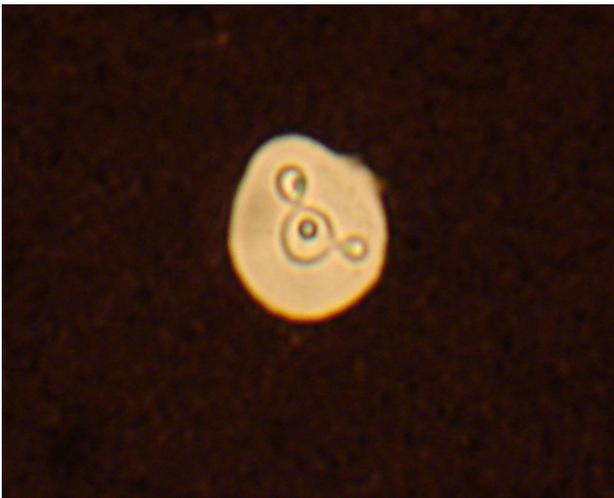


Figuras 5 e 6– Exames a fresco de Urina: a– Cristais de fosfatos amoníaco-magnesianos; b– Eritrócitos; c– Bactérias (à esquerda); e Ovo de *Schistosoma haematobium* (à direita).
Laboratório de Microbiologia da CSE- Agostinho, J.M.M.



Figuras 7 e 8– Exames a fresco de Fezes: Ovo de *Ascaris lumbricoides* (à esquerda); e Larva de *Strongyloides spp.* (à direita).
Laboratório de Microbiologia da CSE- Agostinho, J.M.M.

Após coloração, poderão determinar-se padrões colorimétricos e morfológicos, detectarem-se estruturas especiais (esporos, cápsulas, flagelos) dos diferentes elementos que constituem a amostra. Para casos específicos podem utilizar-se colorações especiais.



Figuras 9 e 10– Exames após coloração: Tinta da china– Líquido cefalorraquidiano– *Cryptococcus neoformans* (à esquerda); e Coloração de Gram-Feces- a– Fungos leveduriformes; b– Bacilos Gram positivos; c– Bacilos Gram negativos; d– Cocos Gram positivos.

Laboratório de Microbiologia da CSE- Agostinho, J.M.M.

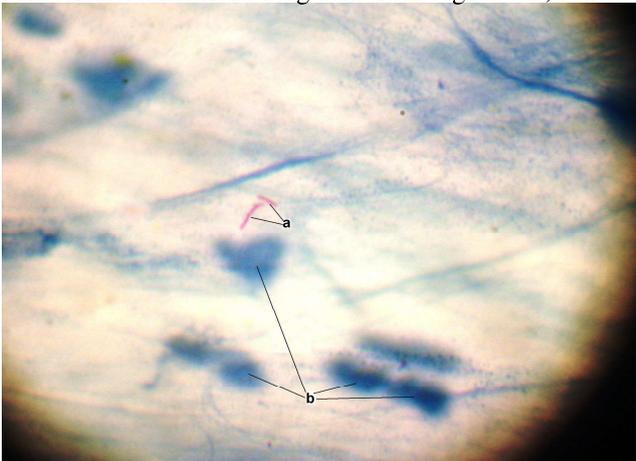


Figura 11– Exame após coloração– Coloração de Ziehl-Neelsen– Expectorção- a– Bacilos Ácido Álcool Resistentes; b– Células inflamatórias.

Laboratório de Microbiologia da CSE- Agostinho, J.M.M.

Exames Directos para Pesquisa e Identificação de Antígenos e/ou Anticorpos

As técnicas a utilizar neste passo são muito variadas, nomeadamente imunológicas (aglutinação, imunofluorescência directa, imunoperoxidase directa, ELISA, etc.) e moleculares (PCR, sondas, hibridação, sequenciação).

Esta detecção directa sobre as amostras, quando possível, tem a vantagem de fornecer um diagnóstico muito rápido e de, muitas vezes, não necessitar da viabilidade biológica do agente. Por exemplo, num líquido cefalorraquidiano podemos detectar os antígenos capsulares dos principais agentes implicados nas meningites sem que estes, posteriormente,

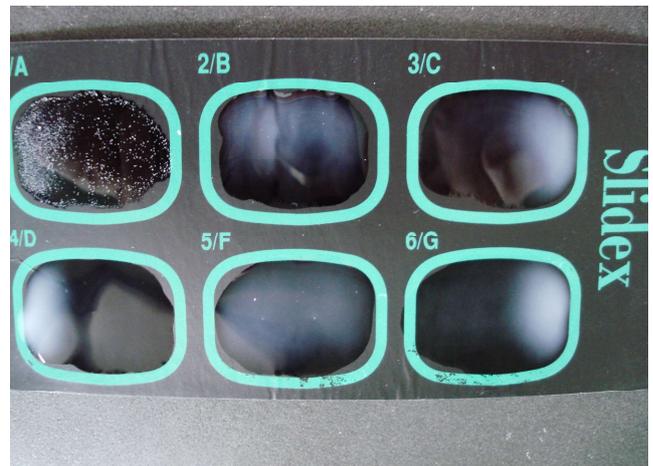


Figura 12– Prova de aglutinação– Slidex Meningite Kit– Aglutinação positiva em A.

Laboratório de Microbiologia da CSE- Agostinho, J.M.M.

cresçam nos meios de cultura artificiais, seja qual for a razão porque isto acontece.

Isolamento dos Agentes

Este passo no diagnóstico tem por fim último a separação do agente causador da doença dos outros agentes comensais ou que fazem parte da microbiota normal da região donde foi colhida a amostra.

O isolamento faz-se por sementeira da amostra em meios de cultura inertes, sólidos ou líquidos, ou por inoculação em animais de laboratório (ratinho, cobaia, hamster, coelho, macaco, etc.), em ovos embrionados de diversas espécies ou em culturas celulares.

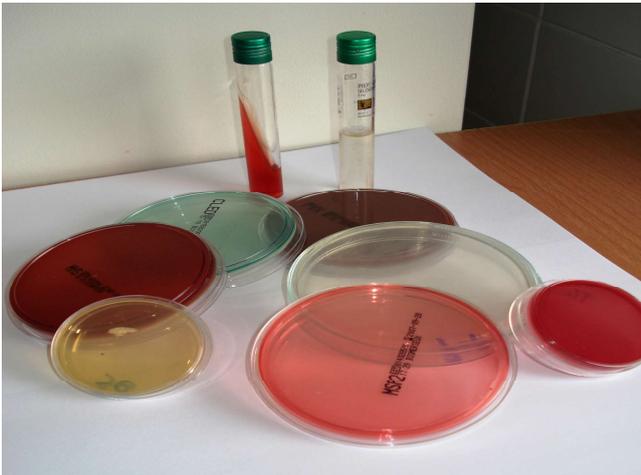


Figura 13– Meios de cultura inertes(sólidos, líquidos, em tubo e em Placa de Petri).
Laboratório de Microbiologia da CSE- Agostinho, J.M.M.

A selecção, tanto dos meios inertes como dos suportes vivos que serão utilizados para o isolamento de cada caso, dependem e variam de laboratório para laboratório, de amostra para amostra, de situação para situação e até de laboratorista para laboratorista.

Identificação dos Agentes

Após o isolamento de um agente há que identificá-lo, isto é, dar-lhe um nome, uma identidade. Para isso o laboratorista segue toda uma série de passos que devem ser sistematicamente registados.



Figuras 15 e 16 – Gelose Chocolate– Colónias em onda típicas de *Proteus spp* (à esquerda); e Gelose sangue a. colónias β-hemolíticas; b. Colónias não hemolíticas (à direita). Laboratório de Microbiologia da CSE- Agostinho, J.M.M.

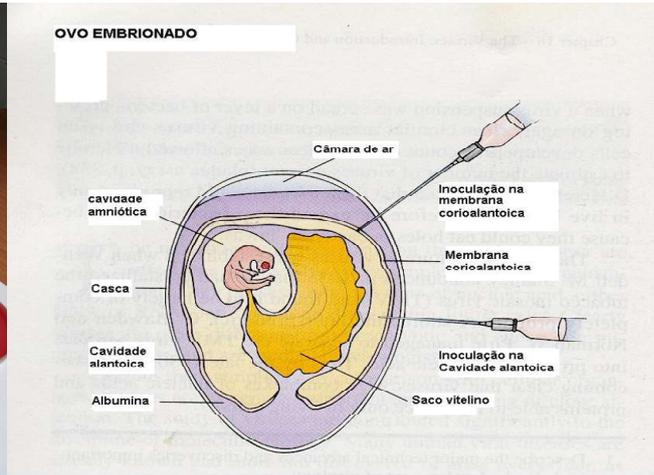
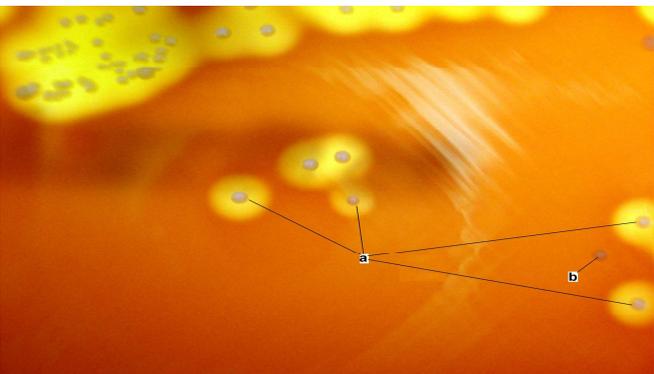


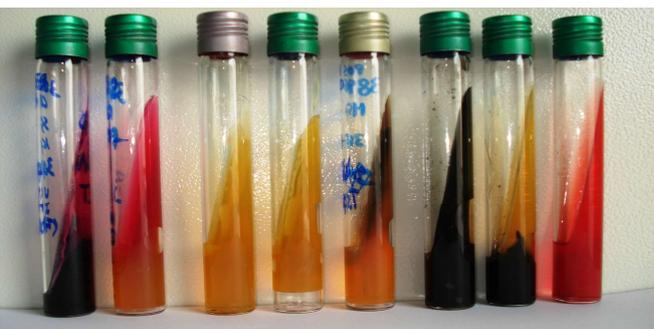
Figura 14– Inoculação em ovo embrionado – Estrutura do ovo e algumas vias de inoculação. Adaptado de Prescott L et al. Microbiology- 4th edition – 1999 – pag. 338

Aspecto macroscópico das sementeiras

As sementeiras dos meios inertes, após um período de incubação adequado a temperaturas, humidade e atmosferas (aerobiose, microaerofilia, anaerobiose, etc.) apropriadas a cada tipo de agente, são observadas para se ver o tipo de colónias (dimensões, aspecto, cor, forma, etc.), se há ou não turvação dos meios líquidos, mudanças de cor, se há presença de hemólise ou não e muitos outros caracteres que, de tão numerosos, é impossível mencioná-los a todos no âmbito deste trabalho.



Figuras 17 e 18 – Meios colorimétricos– Gelose sabouraud—a– *Candida não albicans*; b– *Candida albicans* (à esquerda); e Meio de Kligler e reacções observadas com diferentes bactérias– glucose; lactose; produção de gás e produção de gás sulfídrico (H₂S).(à direita) Laboratório de Microbiologia da CSE- Agostinho, J.M.M.





Figuras 19 e 20 – Meios líquidos (Caldos): a– Por inocular; b– Inoculados e com crescimento bacteriano (à esquerda); e para hemoculturas. Frasco de anaerobiose negativo(a) e positivo (a1); Frasco de anaerobiose negativo (b) e positivo (b1); c– Frasco para pediatria negativo. (à direita) Laboratório de Microbiologia da CSE- Agostinho, J.M.M.

No caso da inoculação a suportes vivos, há que observar e anotar os sinais e sintomas dos animais inoculados e observar as alterações nos ovos embrionados e nas culturas celulares,

nomeadamente morte embrionária ou celular, paralisias, hemorragias, balonamento ou engelhamento celular, descolagem do suporte sólido, etc.

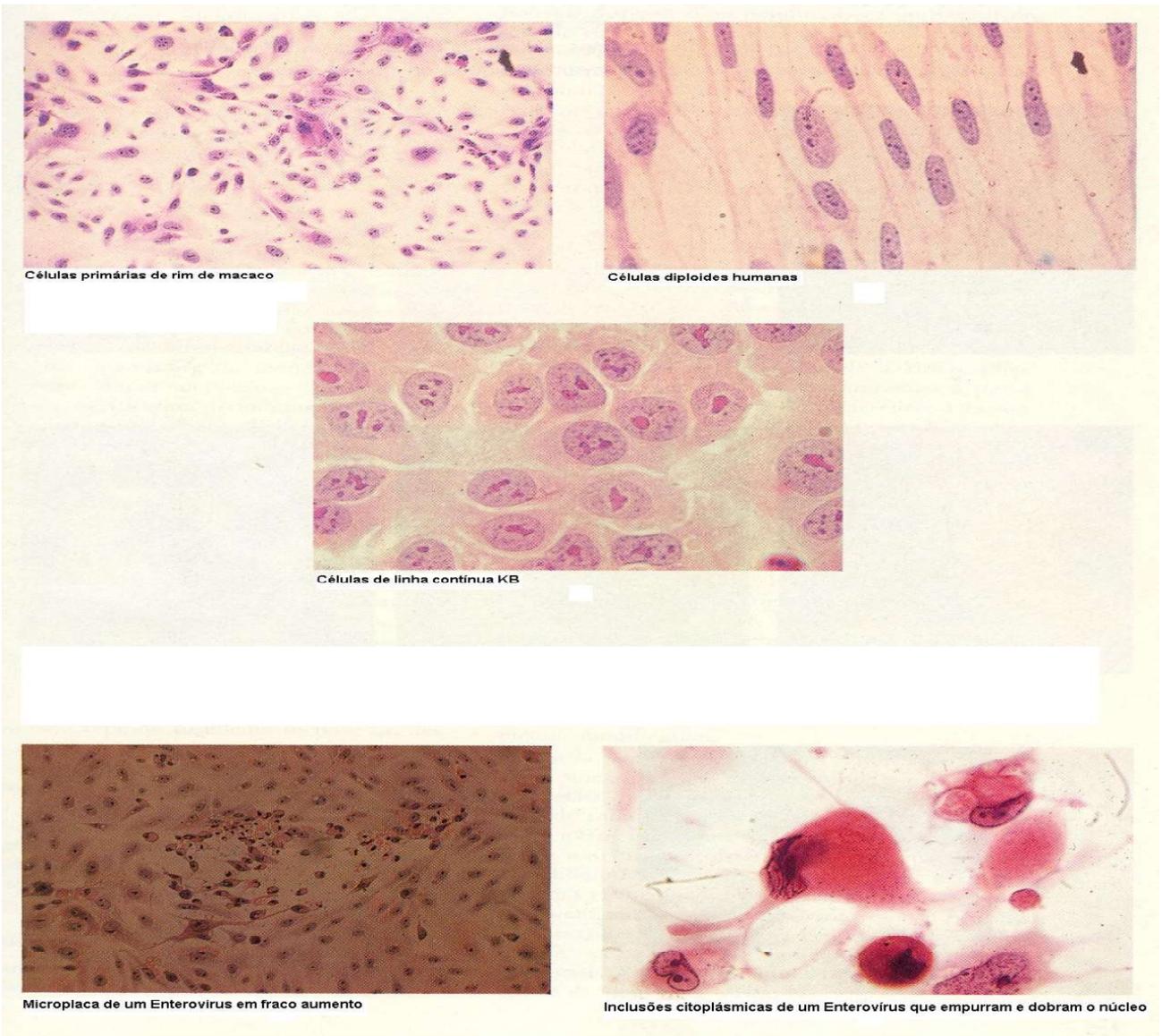
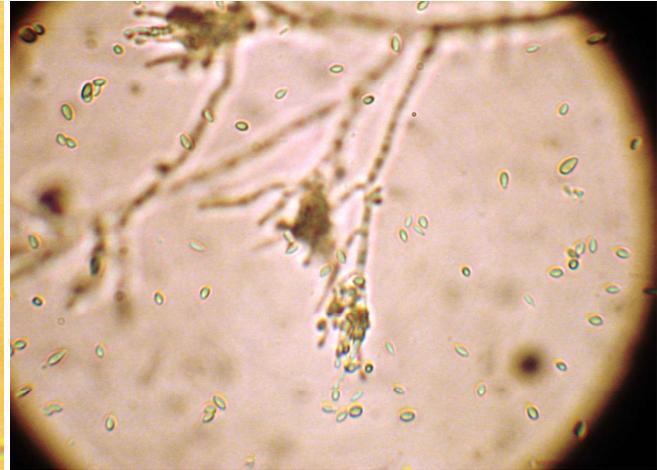


Figura 21– Culturas celulares: Diferentes tipos.
 Adaptado de Prescott L et al. Microbiology- 4th edition – 1999 – pag. 338

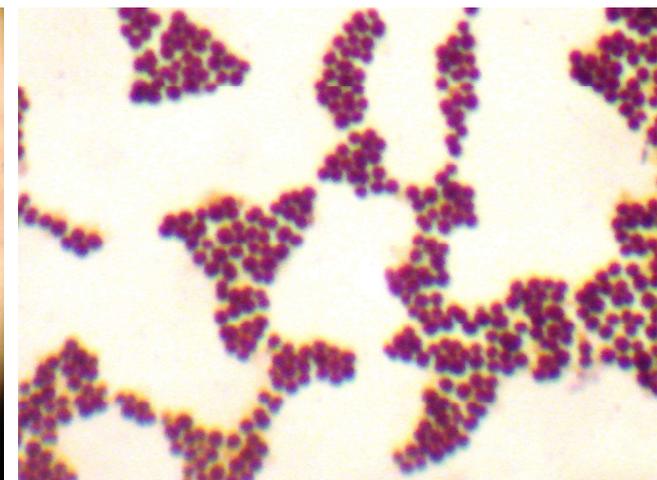
Observação microscópica das sementeiras e inoculações

Após a observação do aspecto macroscópico das sementeiras há, geralmente, necessidade de realizar a sua observação microscópica. Estas

observações podem, tal como no exame directo das amostras, ser realizadas a fresco ou após o uso de colorações variadas adequadas a cada caso, consoante a orientação do diagnóstico.



Figuras 22 e 23 – Exames a fresco após cultura: *Steptococcus spp* (à esquerda); e Fungos e seus esporos. (à direita). Laboratório de Microbiologia da CSE- Agostinho, J.M.M.



Figuras 24 e 25 – Exames após cultura. Coloração de Gram: a– Fungos leveduriformes; b– Bacilos Gram negativos (à esquerda); e Cocos Gram positivos (à direita). Laboratório de Microbiologia da CSE- Agostinho, J.M.M.

Estudo do metabolismo dos agentes

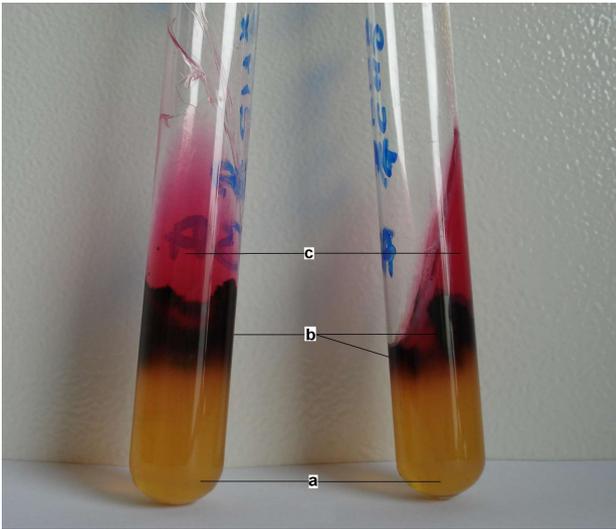
Em seguida há que realizar, em alguns casos, linhas bioquímicas para estudar o metabolismo do agente em causa e identificá-lo. O estudo do metabolismo pode ser feito por técnicas e utilizando sistemas muito diversos (tubos, placas, microtúbulos, etc.) que revelarão, no fundo, o equipamento enzimático, ainda que parcialmente, de que o agente dispõe para viver e se relacionar no meio ambiente em que vive.

Estudos imunológicos e moleculares

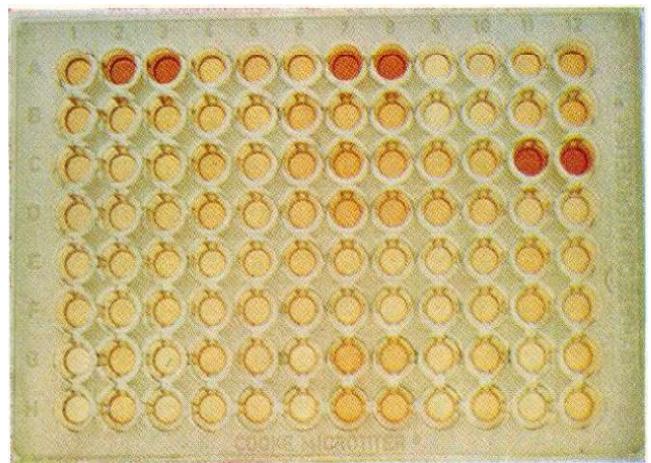
Muitas vezes os estudos do metabolismo de

um agente não são suficientes para o identificar. Nestes casos deve complementar-se o estudo com exames imunológicos e moleculares se necessário for. Tanto nuns como noutros existe toda uma panóplia de técnicas, umas mais adequadas a determinadas situações que outras e que serão seleccionadas consoante as capacidades humanas e materiais existentes no momento da realização do diagnóstico.

Nas técnicas imunológicas citaremos apenas a de precipitação, aglutinação, hemaglutinação e sua inibição, hemadsorsão, imunofluorescência directa e indirecta, ELISA, etc.



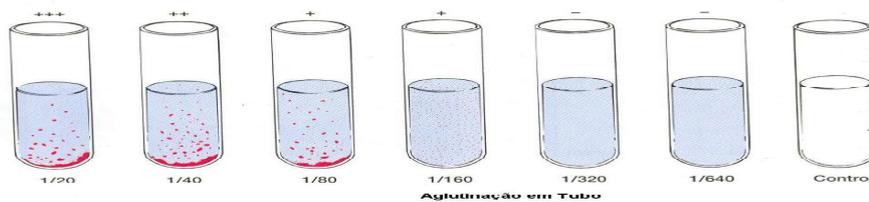
Figuras 26 e 27 – Estudos do metabolismo. Em tubo Kligler: a– Fermentação de glucose ; b– Produção de H₂S; c– Não fermentação da lactose (à esquerda); e, Em sistema API: Diferentes reacções num API 20 E (à direita).
Laboratório de Microbiologia da CSE- Agostinho, J.M.M.



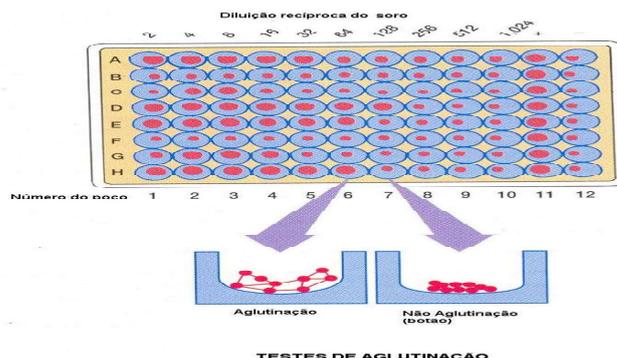
PROVA DE ELISA

Figura 28– Estudo do metabolismo em sistema VITEK. Diferentes reacções numa carta GN.
Laboratório de Microbiologia da CSE- Agostinho,

Figura 29– Técnicas Imunológicas. Prova de ELISA.
Laboratório de Microbiologia da CSE- Agostinho, J.M.M.



Aglutinação em Tubo



TESTES DE AGLUTINAÇÃO

Figura 30– Técnicas Imunológicas: Provas de aglutinação em tubo e microtúbulo.
Adaptado de Prescott L et al. Microbiology- 4th edition – 1999 – pag. 667

Nas técnicas moleculares mencionaremos a PCR, a hibridação e a sequenciação.

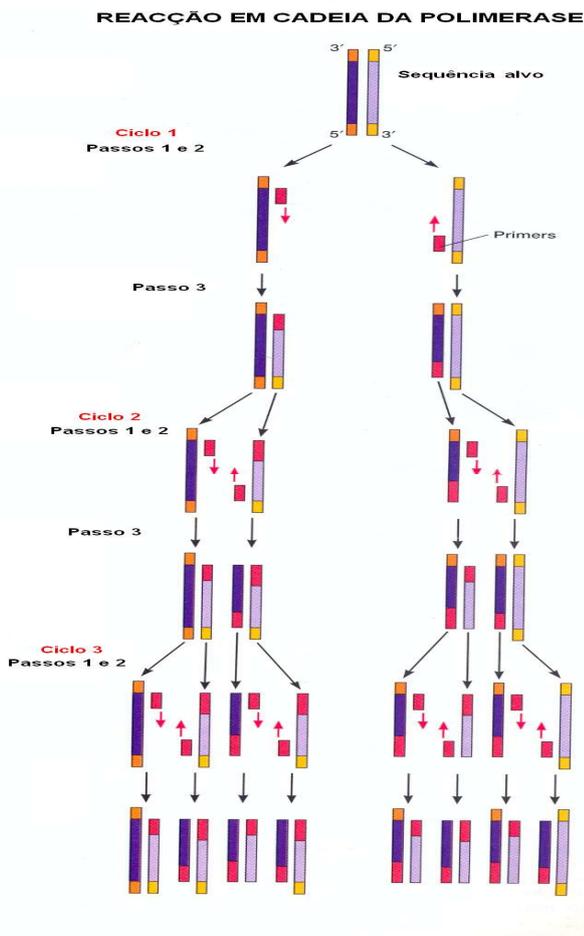


Figura 31– Técnicas de reacção em cadeia da polimerase (PCR) Adaptado de Prescott L et al. Microbiology-4th edition – 1999 – pag. 317

Determinação de Quimioterápicos Anti-Agentes Isolados e Identificados

Após o isolamento, identificação e avaliação da importância médica do agente ou agentes, quando possível e sempre que necessário, há que estudar a sua sensibilidade frente a fármacos, detectar mecanismos de resistência ou determinar a existência ou não de genes de resistência.

Os testes de sensibilidade aos antibióticos são realizados por difusão em placa, em meios líquidos ou por inibição do crescimento do agente em culturas celulares.

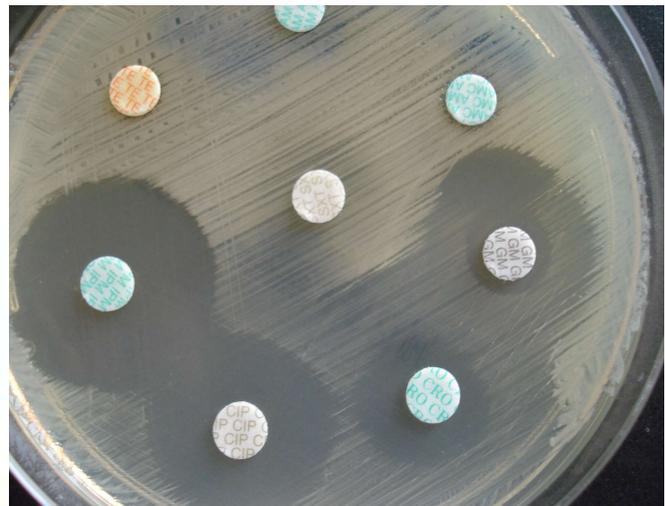


Figura 32– Teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA) por difusão em placa. Laboratório de Microbiologia da CSE- Agostinho, J.M.M.

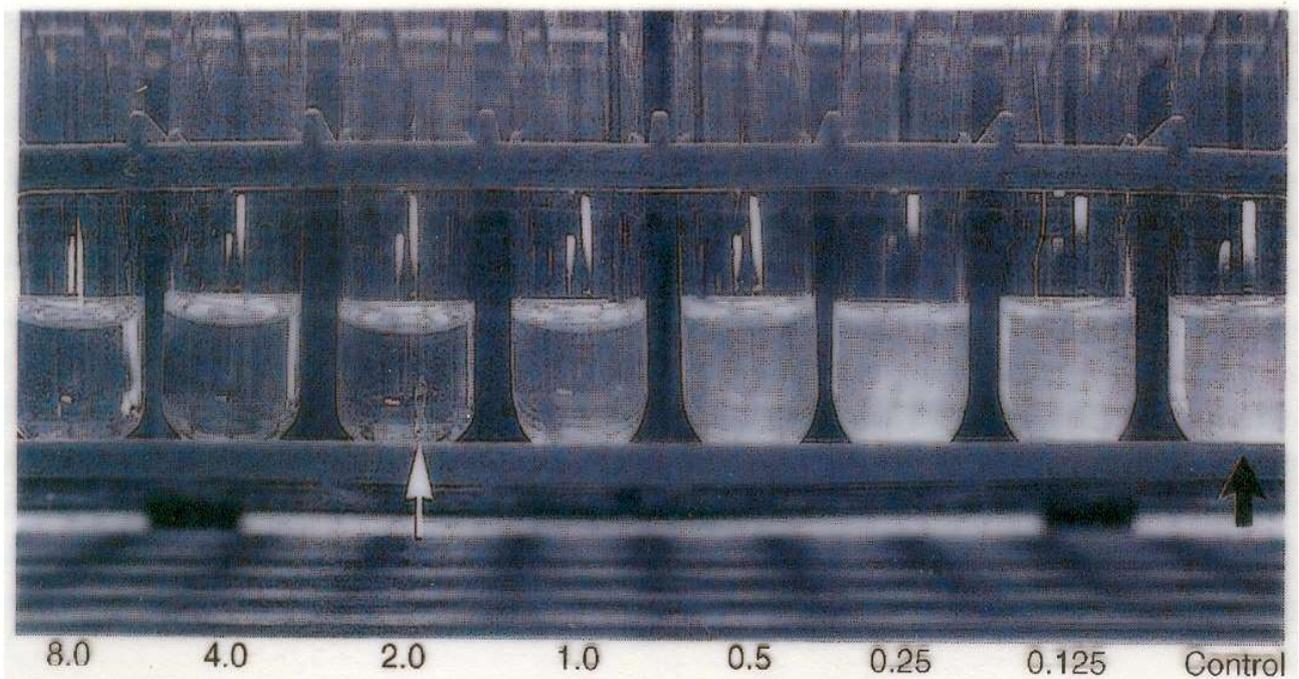


Figura 33– Teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA) em meio líquido.

Adaptado de: Infectious Disease Of North America– The role of the clinical microbiology Laboratory in the Diagnosis and Therapy of Infectious Disease– Dezembro de 2001– Volume 15– Número 4.



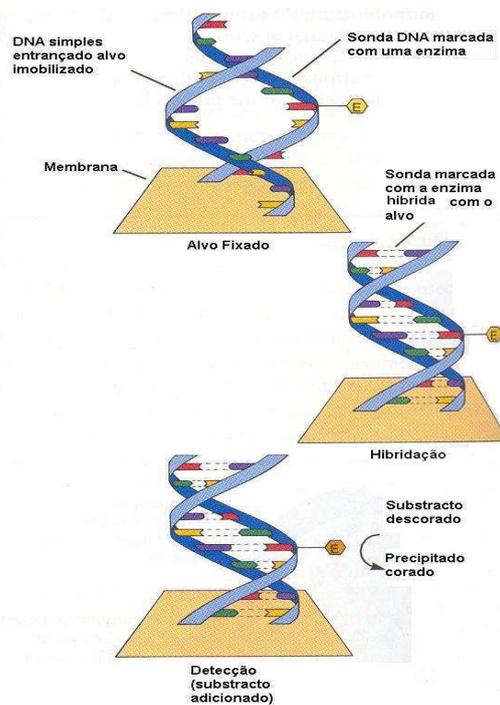
Figura 34– Teste de Sensibilidade aos Antibióticos (TSA) em meio líquido no sistema VITEK. Laboratório de Microbiologia da CSE- Agostinho, J.M.M.

A existência ou não de genes de resistência é determinada por técnicas moleculares que detectam genes que se sabe estarem relacionados com resistências.

Agradecimentos

À Dr.^a Maria Helena Fonseca de Victória Pereira por todo o seu apoio, pela revisão geral final do texto e pela ajuda na selecção e legendagem das figuras.

À Dr.^a Paula Victória Pereira Agostinho pela



TÉCNICA DE HIBRIDAÇÃO

Figura 35– Técnicas moleculares de detecção de genes de resistência– Hibridação. Adaptado de Prescott L et al. Microbiology- 4th edition – 1999 – pag. 716

tradução para inglês do resumo e das palavras-chaves.

A todo o pessoal do Laboratório de Microbiologia da Clínica Sagrada Esperança (CSE) pelo trabalho diário que possibilitou a realização do grosso das imagens apresentadas.

BIBLIOGRAFIA

1. Courvalin P.; Goldstein F.; Philippon A.; Sirot J. – 1980 – L'ANTIBIOGRAMME
1^a Edition – mpe-Videona

2. Minor L. le; Véron M. – 1984 – BACTÉRIOLOGIE MÉDICALE – 1^a Edition – Flammarion Médecines Sciences

3. Vandepitte J.; Engbaek K.; Piot P.; Heuck C.C. – 1993 – MÉTODOS BÁSICOS DE LABORATORIO EN BACTERIOLOGÍA CLÍNICA – Organizacion Mundial de la Salud – Ginebra

4. Vários Autores – 1987 – TRAVAUX PRATIQUES DU C.E.S. DE BACTÉRIOLOGIE ET VIROLOGIE MÉDICALES – Faculté de Médecine - Paris

5. Abecassis, M. B; Barros, R. M; Bento, R. F; Calheiros, I; Costa, M. T. M. P. M; Fonseca, A. B; Martins, F. J. C; Pinheiro, M. P. S. F. M; Pinto, M. I. F; Ribeiro, M. G. V. C; Sebastião, C; Spencer, M. O. C. – 2004 – ORIENTAÇÕES PARA A ELABORAÇÃO DE UM MANUAL DE BOAS PRÁTICAS EM BACTERIOLOGIA – Ministério

da Saúde – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge – Programa Nacional de Controlo de Infecção – Portugal

6. The Williams et Wilkins Company/Baltimore – BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY.

7. Afonso, A. - BOAS PRÁTICAS LABORATORIAIS EM MICROBIOLOGIA – Serviço de Patologia Clínica, Laboratório de Microbiologia, Hospital de S. Miguel – 2006.

8. Infectious Disease Clinics of North America - THE ROLE OF THE CLINICAL MICROBIOLOGY LABORATORY IN THE DIAGNOSIS AND THERAPY OF INFECTIOUS DISEASE — Dezembro de 2001 – Volume 15 – Número 4.

9. Ferreira, W.F.C. e Sousa, J.C.F. - MICROBIOLOGIA – Vol. 1, 2 e 3 – 1998, 2000 e 2002.

10. Prescott, L.M.; Harley, J.P; Klein, D.A. - MICROBIOLOGY - 4th Edition - The McGraw-Hill Companies - 1999.