



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Mara Costa Almeida

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

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

Setembro de 2022

Mara Costa Almeida

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

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

Setembro de 2022

1 2



9 0

UNIVERSIDADE D
COIMBRA

AGRADECIMENTOS

É com muito agrado que inicio este relatório agradecendo a todas as pessoas que me acompanharam durante este estágio.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à professora Doutora Teresa Dinis, pelo acompanhamento, disponibilidade constante e apoio ao longo deste tempo.

De seguida, devo agradecer à minha família nomeadamente, irmãos Gonçalo e Filipe, pais, avós e restantes familiares que foram um constante pilar.

Às minhas amigas de faculdade, pelo apoio, preocupação e entre ajuda, nomeadamente a Daniela, Cristiana, Diana e Joana Leal, por todo o carinho e incentivo que me deram, sem elas nada teria sido possível.

A todos os colaboradores do laboratório, pela ajuda constante e integração na equipa.

E por fim às restantes pessoas importantes na vida, que de uma maneira ou de outra também contribuíram para a realização deste relatório.

ABREVIATURAS	1
RESUMO	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO	6
3. FASE PRÉ ANALÍTICA	8
3.1Triagem e separação de amostras	11
4. FASE ANALÍTICA	12
5.CONTROLO DE QUALIDADE	12
5.1Controlo de Qualidade Interno	12
5.2Controlo de Qualidade externo.....	13
6.HEMATOLOGIA	13
6.1Hemograma.....	15
6.1.2Autoanalisador e princípio de funcionamento	15
6.1.3Eritrograma	16
6.1.4 Leucograma	18
6.1.5 Plaquetograma	20
6.2 Esfregaço de sangue periférico	21
6.3 Coloração May-Grunwald-Giemsa	21
6.4 Alterações eritrocitárias	22
6.4.1Tamanho dos eritrócitos	22
6.4.2Alterações na forma dos eritrócitos.....	23
6.4.3 Coloração dos eritrócitos	23
6.4.4Alterações na distribuição dos eritrócitos	23
6.5 Velocidade de Sedimentação	24
6.6 Quantificação de variantes da hemoglobina	24
6.7Testes da Coagulação Sanguínea	25
6.7.1Tempo de Protrombina	26
6.7.2Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada	26
6.7.3Tempo de Trombina	27
6.8 Equipamento STA Compact Max Systems.....	27
6.9 Outras determinações analíticas.....	27
6.10Teste direto da Atiglobulina.....	27
6.11Teste de Coombs Indireto	28
6.12Determinação de Grupos Sanguíneos.....	28
6.13Caso Clínico	30

7.MICROBIOLOGIA	32
7.1Urina.....	33
7.1.2Exame Macroscópico	34
7.1.3Exame Microscópico Direto	34
7.1.4. Coloração de Gram.....	34
7.1.5Exame Cultural	35
7.2Fezes.....	39
7.2.3Exame Direto.....	39
7.2.4Exame bacteriológico	40
7.2.5Exame micológico.....	41
7.2.6Exame parasitológico	42
7.3Deteção de antígenos de <i>Helicobacter pylori</i> , adenovírus, rotavírus	43
7.4Exsudato vaginal.....	43
7.4.1Exame direto e cultural	43
7.4.2Pesquisa de <i>Streptococcus agalactiae</i>	44
7.5Exsudatos purulentos.....	45
7.5.1Exame direto e cultural	45
7.6 Exsudato orofaríngeo	46
7.6.1Exame direto	46
7.6.2 Exame cultural.....	47
7.7Expetoração	47
7.7.1Exame direto	48
7.7.2Exame cultural.....	48
7.8.Teste de suscetibilidade a antimicrobianos	49
7.9 Técnicas Manuais	51
7.10 Caso Clínico	52
8.IMUNOLOGIA	53
9.BIOQUÍMICA	54
10.CONCLUSÃO	55
11.ANEXO	56
12.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

ABREVIATURAS

ANA – anticorpo antinuclear

APTT - tempo de tromboplastina parcialmente ativada

BK - bacilo de Koch

BTT - β -talassemia

CHCM - Concentração da hemoglobina corpuscular média

CQE - controlo de qualidade externo

CQI - controlo de qualidade interno

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra- Acético

E.coli- Escherichia coli

AHAI – anemia hemolítica autoimune

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

INR – *International Normalized Ratio*

Hb - hemoglobina

HbA – hemoglobina A

HbA2 – hemoglobina A2

HA1C - hemoglobina glicada

HbF – hemoglobina F

HCM – hemoglobina corpuscular média

HCT - hematócrito

HGM - hemoglobina corpuscular média

HLA B27- human leukocyte antigen B27

HPLC – cromatografia líquida de alta pressão

H. Pylori- Helicobacter pylori

INR - *international normalized ratio*

LC - laboratório central

LMC – leucemia mieloide crónica

MO - medula óssea

NK - *natural killer*

NRBC- membrana dos eritroblastos

PDF – produtos de degradação de fibrina

PT – tempo de protrombina

PTT – tempo de trombina

PCV – *packed cell volume*

RBC – contagem de glóbulos vermelhos, do inglês *red blood cells*

RDW – *red cell distribution width*

RPM- rotações por minuto

RIQAS – *Randox International Quality Assessment Scheme*

SARS-CoV-2 – síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2

SS- Salmonela Shigela agar

S. aureus- Staphylococcus aureus

TSDST- técnicos superiores de diagnóstico e terapêutica

UK NEQAS - *United Kingdom National External Quality Assessment Service*

VCM – volume corpuscular médio

VS - velocidade de sedimentação

ZN - *Ziehl-Neelsen*

RESUMO

Neste relatório descrevo as atividades realizadas durante o estágio curricular no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) realizado no Laboratório Médico de Análises Clínicas, Avelab, em Aveiro. Para tal, abordo a importância da caracterização do laboratório, as diversas fases analíticas, a dinâmica laboratorial, a importância da amostra, metodologias, equipamentos e parâmetros determinados com maior frequência em cada um dos setores.

Neste estágio tive possibilidade de acompanhar e executar muitas das determinações realizadas nos diversos setores, nomeadamente na Hematologia, Imunologia, Bioquímica Clínica e Microbiologia, assim como, consolidar a minha capacidade crítica através da interpretação dos resultados obtidos.

O objetivo principal deste relatório consiste na descrição das 4 áreas laboratoriais onde estagiei, dando especial relevância às áreas de Hematologia e Microbiologia.

Palavras-Chave: Análises Clínicas; Hematologia; Microbiologia

ABSTRACT

In this report I will describe the activities carried out during the curricular internship under the Master of Clinical Analyses of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra (FFUC) held at the Medical Laboratory of Clinical Analyses, Avelab, in Aveiro. As such, I will address the importance of the laboratory description, the various analytical phases, laboratory dynamics, namely samples, methodologies, equipment and the parameters that are determined more frequently in each of the sectors.

In the internship I had the possibility to monitor and execute the existing techniques in the various sectors, namely Hematology, Immunology, Clinical Biochemistry and Microbiology. As well as consolidate my critical capacity through the interpretation of the results obtained.

The main goal of this report is the description of the 4 areas carried out throughout the internship, giving special relevance to the areas of Hematology and Microbiology.

Keywords: Clinical Analyses; Hematology; Microbiology

1. INTRODUÇÃO

A área das análises clínicas está em constante crescimento e a sua importância é cada vez mais notória. É um auxiliar importante no diagnóstico das mais diversas patologias, utilizando um número de amostras cada vez maior. Esta área foi colocada, mais uma vez em destaque, devido à pandemia que se fez sentir e não deixou ninguém indiferente. Esta veio demonstrar que sem os profissionais de saúde, das mais diversas áreas o seu combate parcial seria impossível, nomeadamente os profissionais das análises clínicas, cujo trabalho foi crucial no diagnóstico e controlo da transmissão do vírus SARS-CoV-2.

O meu estágio curricular do Mestrado em Análises Clínicas foi realizado no Laboratório Médico de Análises Clínicas AVELAB com duração de cerca de 6 meses, de 4 de janeiro de 2021, a 30 de junho de 2021. Durante este estágio permaneci um mês nos diferentes setores que constituem o laboratório, nomeadamente, hematologia, bioquímica clínica, imunologia, microbiologia e triagem de amostras.

O estágio permitiu conhecer a realidade de um laboratório desde a compreensão dos princípios base da automatização laboratorial nos diversos setores, ao tratamento de cada uma das amostras desde a fase pré analítica à entrega do boletim analítico ao utente.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original. “

Albert Einstein

2. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO

O laboratório AVELAB é um laboratório Médico de Análises Clínicas com 65 anos de existência. A sua sede localiza-se na Rua Cerâmica do Vouga, nº13, 3800-011 Aveiro. É dirigido pelo Dr Américo Lopes Freitas, médico especialista, no entanto também pertencem à direção clínica a médica especialista, Dra Teresa Raposo, assim como os farmacêuticos especialistas Doutor António Ferreira Neves, Dra Irene Sá e Dra Lurdes Pereira.

O AVELAB tem vindo a crescer exponencialmente, o que é notório com o número elevado de postos de colheitas, que já se estende por mais de 60 concelhos nas regiões Norte e Centro de Portugal Continental, incluindo o laboratório central que tem aproximadamente um fluxo de 200 utentes por dia. O laboratório visa dar uma melhor qualidade científica nos resultados a cada utente, um melhor atendimento e todas as condições inerentes a esta garantia de qualidade. Também possui uma política de privacidade através de medidas administrativas e tecnológicas segundo o Regulamento Geral de Proteção de dados e de acordo com a Lei 58/2019.

Devido às distâncias dos postos de colheita em relação ao laboratório central é necessário um maior rigor no armazenamento e transporte das amostras, para tal estes dispõem de centrífugas, frigoríficos, arcas e diversos materiais para o devido acondicionamento de cada uma das amostras.

Este laboratório dispõe também de técnicos/as competentes para a realização do serviço de colheitas ao domicílio, nomeadamente a idosos com dificuldade de locomoção, diversas instituições, tais como lares, etc.

A administração trata do atendimento de cada utente, receção das várias requisições de análises e posterior registo informático, em cada um dos postos de colheitas. Posteriormente as amostras de cada um dos postos de colheitas são rececionadas no laboratório central, onde são reencaminhadas para os diversos setores. O registo das amostras é realizado com as iniciais de cada um dos postos de colheita, seguido do número de processo de cada utente constituído por 4 dígitos fixos. Por último 4 dígitos indicativos do setor para onde vai ser encaminhada a amostra. Por exemplo LC (Laboratório Central) nº do processo de cada utente, 0500 (setor de hematologia). Os resultados das mesmas são enviados por email, se o utente assim o desejar, ou levantadas

fisicamente no LC ou no posto de colheitas, conforme a situação, mediante o talão de levantamento que contém a data prevista do resultado e o cartão de cidadão.

Este laboratório está dividido em diversos setores, designadamente: a Hematologia que possui também o setor da coagulação, a Microbiologia que também possui o setor de urinas e fezes e por fim o setor da Bioquímica, que também possui o setor da imunohistoquímica. Além destes possui uma sala de triagem, uma sala de informática, 3 salas de colheitas de sangue, 2 salas e uma tenda para colheitas de exsudatos orofaríngeos e nasofaríngeos para deteção de SARS-CoV-2, uma sala para a realização de eletrocardiogramas e por fim a receção e sala de espera.

O setor da hematologia trabalha essencialmente com 2 tipos de amostras, o sangue total, colhido para tubo com anticoagulante, o sal tripotássico EDTA, de tampa roxa e plasma obtido a partir de sangue colhido para tubo com citrato de sódio, tampa azul. Estas amostras são triadas e posteriormente passam por cada um dos autoanalisadores para análise e emissão dos respetivos resultados. Aqui podem ser determinados vários parâmetros, nomeadamente o hemograma, hemograma diferencial com plaquetas, hemoglobina glicada (HbA1C), velocidade de sedimentação e esfregaços sanguíneos; com a amostra colhida no tubo com citrato de sódio podem ser determinados os seguintes parâmetros, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcialmente ativada, tempo de trombina e fibrinogénio. Todas estas determinações contribuem para o diagnóstico de diversas patologias.

Ao setor da microbiologia pode chegar uma grande diversidade de amostras designadamente: urina, fezes, exsudatos, esperma, cabelo e unhas. Os procedimentos utilizados são os mais diversificados podendo ser manuais e automatizados. Aquando da chegada das amostras ao laboratório, estas são triadas e seguidamente procede-se ao seu tratamento consoante o tipo de amostra e a análise pedida. Os resultados são mais morosos devido ao tempo de tratamento de cada amostra até se chegar a um possível diagnóstico final.

No setor da bioquímica a amostra de eleição é o soro colhido num tubo com gel separador, de tampa amarela ou vermelha. Aqui são determinados um maior número de parâmetros desde os mais comuns que fazem parte da maioria das análises de rotina, como o colesterol, glicose, triglicéridos, etc, até aos menos comuns. Neste laboratório o setor de imunologia é comum ao da bioquímica, para isso são utilizados 3 autoanalisadores, designadamente Architect 1 e 2 constituídos por dois módulos, um

onde são realizadas as determinações bioquímicas e o outro onde são realizadas as determinações do âmbito da imunologia. Por último existe um terceiro autoanalisador, onde são realizadas essencialmente determinações de alguns fármacos e anticorpos anti spike.

O setor de imunohistoquímica compreende também uma sala individual com 2 autoanalisadores essenciais: Phadia e Rast que são utilizados para determinações dos mais diversos tipos de alergénios. A amostra utilizada é o soro.

O laboratório dispõe de 2 sistemas informáticos: Wappolo, para a inscrição das amostras e Apollo para tratamento e emissão de resultados. Neste último é gerado o número de processo que permite acompanhar a amostra ao longo do seu percurso pelo laboratório. Este sistema encontra-se conectado aos autoanalisadores, aos sistemas de entrada e de arquivo, que se encontram no setor da triagem, de modo a não perder nenhuma amostra nem falhar a realização de nenhuma análise no processo do doente. No final de cada dia o responsável de cada setor consegue aceder à lista das faltas de cada parâmetro ou conjunto de parâmetros e assim poder verificar se as amostras foram todas processadas e se o envio dos resultados foi todo realizado.

3. FASE PRÉ ANALÍTICA

A fase pré analítica é a mais importante, pois é nesta que ocorrem mais de 70% dos erros. Para os colmatar é necessário que esta seja realizada com o maior rigor possível. Inicia-se com a abertura do processo do utente e registo das análises requisitadas, posteriormente a colheita da amostra e por último o seu transporte até ao laboratório. A refrigeração das amostras durante o transporte, pode levar a alterações significativas de determinados parâmetros. Nesta fase é gerado um código de barras com um número de identificação (número do processo) e as iniciais do posto de colheita. Fica igualmente registada a data/hora de entrada, o responsável que a executou, assim como a data prevista dos resultados. Os parâmetros requisitados estão registados no sistema, ficando esta informação disponível para o pessoal responsável pela execução da análise das amostras no laboratório. No laboratório AVELAB rececionam-se diferentes tipos de colheita de produtos biológicos como consta na tabela seguinte:

Tabela I: Tipos de amostras e produtos biológicos

Produtos Biológicos	Tipo de amostra
sangue	sangue venoso
urina	Primeira da manhã, urina ocasional, urina de 24h, urina de 48h
exsudados	Nasofaríngeos, orofaríngeos, vaginais, retais, uretrais, amigdalino, exsudados de feridas
Outros produtos biológicos	Fezes
	Esperma
	Cabelo, unhas, pele

Durante o estágio tive a oportunidade de fazer colheita de diversos produtos biológicos, maioritariamente de sangue venoso realizada com sistema de agulha e seringa. É de salientar, os diversos cuidados a ter em consideração com a mesma, nomeadamente, o tempo de uso do garrote, que quando prolongado pode provocar hemólise, *in vitro*; a homogeneização dos tubos das amostras sanguíneas; o tempo de retração do coágulo sanguíneo; a limpeza com álcool da zona da picada; verificação das boas condições da seringa-antes de picar; posteriormente deixar que o sangue saia lentamente da seringa para cada um dos tubos tendo em atenção a ordem dos tubos de acordo com os diferentes parâmetros, como representado na Figura 1. Nas colheitas pediátricas ou com acesso venoso difícil a colheita é realizada em tubos específicos pediátricos, com um volume menor. Após a concretização da colheita de sangue deve proceder-se à homogeneização do mesmo.

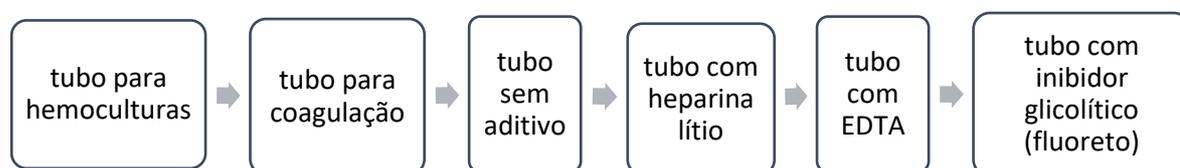


Figura 1: Ordem de fracionamento do sangue pelos tubos utilizados nas colheitas de sangue

Tabela II: Características de cada um dos tubos utilizados no laboratório de análises clínicas

Cor característica do tubo	Anticoagulante que o tubo contém	Amostra preferencial	Análises mais comuns
Roxo	EDTA tripotássico	Sangue total	Hemograma com/sem fórmula leucocitária; Hemoglobina A1c (glicada); Velocidade de sedimentação; HLA B27 (Antigénio); Grupo sanguíneo.
Amarelo	Sem anticoagulante e com gel separador	Soro	Provas Imunológicas e Bioquímicas, Proteinograma e Ionograma; VDRL.
Azul claro	Citrato trissódico 1:9	Plasma	Provas de coagulação
Azul escuro	Sal de EDTA tripotássico	Soro ou sangue total	Provas Imunológicas e Bioquímicas,

O anticoagulante EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético) é o anticoagulante de eleição, tem como principal função a quelação dos iões cálcio para prevenção da coagulação. Quando o tubo possui volume insuficiente de amostra há um aumento da quelação de magnésio e zinco, afetando os valores de enzimas.

A heparina induz uma mudança conformacional da antitrombina III, acelera a inibição da trombina e do Fator Xa, (1,2) que impede a formação da fibrina a partir do fibrinogénio. Possui propriedades quelantes mínimas e concentração relativamente baixa de catiões. No laboratório existem tubos com heparina de lítio e de sódio, que são usados nomeadamente para análises genéticas e determinação de iões como cobre e magnésio.

O citrato de sódio, é comumente usado nos estudos de coagulação pois os efeitos deste anticoagulante são revertidos pela adição de Ca^{+} .

Relativamente à amostra de soro, há formação de coágulo, logo não é adicionado qualquer tipo de anticoagulante. Assim, os tubos incluem gel separador e ativador de coágulo, com o objetivo de separar o soro do sangue total coagulado (1,2).

Durante este período constatei a existência de práticas inadequadas que podem influenciar o restante processo, tais como má etiquetagem/identificação das amostras,

omissão ou incorreta explicação das condições de preparação do utente para a realização colheita.

As amostras colhidas no laboratório central, assim como restantes postos de colheitas são encaminhadas para a triagem em arcas refrigeradoras, devidamente acondicionadas, identificadas e acompanhadas de uma folha de trabalho onde constam todas as amostras que deram saída do posto, identificadas pelos respetivos números mecanográficos. Relativamente às amostras colhidas no laboratório central, estas são identificadas na receção ou na sala de colheitas. Posteriormente, as amostras são divididas por setores, de acordo com as análises requisitadas, e por isso, processadas de diversas formas.

3.1 Triagem e separação de amostras

As amostras, provenientes do laboratório central e dos postos de colheita, seguem para o setor da triagem, onde é realizada a sua separação e preparação. Os tubos sem anticoagulante são triados e centrifugados a 3000rpm/15min, para posterior separação do soro em alíquotas, se necessário, e envio imediato para o setor da Bioquímica e Imunohistoquímica. Existem análises mais específicas, como pró-BNP, metais; teste respiratório para pesquisa de *Helicobacter pylori*, que são realizadas em laboratórios exteriores (Ambar e Cerba). Após a centrifugação são verificados os critérios de rejeição da amostra, nomeadamente se estas estão lipémicas, hemolisadas ou ictéricas e regista-se no processo, pois pode levar a alteração de determinados analitos tais como, bilirrubina, ferro, magnésio, potássio, entre outros. O volume também é conferido, pois se for insuficiente para realizar as análises necessárias, é pedida uma nova colheita de amostra.

As amostras bacteriológicas vão diretamente para o setor da Microbiologia onde são triadas e processadas. Os tubos com EDTA e citrato de sódio vão para o setor de Hematologia onde são devidamente triados, sendo que os tubos com EDTA são colocados no agitador mecânico *Speci-Mix*, e os tubos com citrato sódico vão para o setor de coagulação, centrifugados a 3000 rpm/10min, para consequente obtenção do plasma. As amostras de risco biológico (SARS-CoV-2) e amostras para tipagem genética para pesquisa do HLA-B27 seguem para o setor da Biologia Molecular.

4. FASE ANALÍTICA

A fase analítica compreende a realização da análise nos diversos autoanalisadores, representados no anexo 1, assim como, procedimentos manuais para a determinação de determinados parâmetros ou confirmação dos mesmos.

O processamento analítico deve referir o método utilizado, regras de validação, conservação da amostra antes e depois da análise, manutenção dos locais e dos materiais de trabalho (limpeza, organização, condições especiais: temperatura, corrente elétrica e humidade, quando aplicável). A Garantia de qualidade é da responsabilidade do Diretor Técnico ou de alguém a quem ele delegar (especialista ou técnico superior) e inclui o chamado controlo interno e a avaliação externa da qualidade que em conjunto constituem o sistema de garantia de qualidade dos resultados do laboratório.

5. CONTROLO DE QUALIDADE

O controlo de Qualidade é um procedimento essencial em qualquer laboratório, para a garantia de qualidade, dos resultados e , permite que todos os laboratórios estejam ligados de igual modo. Assim o laboratório deve incluir um controlo de qualidade interno (CQI) e externo (CQE).

5.1 Controlo de Qualidade Interno

O Controlo de Qualidade Interno (CQI) é responsável pela monitorização contínua da reprodutibilidade da fase analítica laboratorial, identificando e eliminando erros inerentes ao processo analítico.

Neste laboratório, o CQI é realizado diariamente nos vários setores antes do início da análise de qualquer amostra, assim como na mudança de cada lote e reagentes. Existem 3 controlos para cada um dos aparelhos em cada setor, sendo estes os controlos baixo, médio e alto. No entanto, devido à logística do laboratório, todos os dias os controlos são intercalados 2 a 2. Os resultados do controlo são apresentados de forma gráfica e numérica, sendo que o intervalo de confiança é de ± 2 desvios padrão, em determinados aparelhos ± 3 desvios padrão. Para a validação do resultado o laboratório segue as regras de Westgard. Caso o valor não se encontre dentro deste limite deve ser investigada a causa

proceder à sua resolução e realizar novas calibrações para posterior análise de todas as amostras. Também é realizada a calibração diária de todos os aparelhos.

5.2 Controlo de Qualidade externo

Tal como existe a avaliação interna o laboratório também está sujeito a uma avaliação externa. Para tal participa em dois programas de avaliação externa, designadamente, RIQAS “*Randox International Quality Assessment Scheme*” e UK NEQAS “*United Kingdom National External Quality Assessment Service*”. O Controlo de Qualidade Externo (CQE) é realizado uma vez por mês em todos os setores do laboratório. Os controlos são tratados como amostras de utentes e os resultados são enviadas para o programa de controlo de qualidade externo responsável. Posteriormente é reportado ao laboratório o resultado da amostra. Em caso de conformidade o laboratório pode prosseguir com as suas amostras, no caso de haver alguma inconformidade é investigada a causa e procede-se à sua resolução.

6. HEMATOLOGIA

Na hematologia a amostra de eleição é o sangue total, constituído pela parte líquida, designada de plasma e pelos elementos celulares a série vermelha, a série branca e as plaquetas. Esta área fornece informação útil no diagnóstico e tratamento de várias doenças, para além das chamadas doenças do sangue. A patologia mais comum é a anemia, que consiste na diminuição do conteúdo de hemoglobina, eritrócitos e hematócrito; outra patologia relativamente comum é a leucemia, que é uma neoplasia que tem início nas células estaminais da medula óssea, afetando essencialmente a série branca (3).

. Neste setor são rececionados dois tipos de tubos com sangue total. Um contém EDTA como anticoagulante (tubo com tampa roxa); o outro contém citrato de sódio como anticoagulante (tubo com tampa azul). Os tubos com EDTA são utilizados para a realização de análises tais como, hemograma, velocidade de sedimentação e avaliação da hemoglobina glicada, HbA1c.—O EDTA remove o cálcio ionizado (Ca^{2+}) através de um processo de quelação impedindo o desencadeamento da cascata da coagulação. Em adição, conserva a morfologia dos eritrócitos e leucócitos e facilita a contagem de plaquetas. A amostra deve ser bem homogeneizada e processada até 2- 4 horas após a colheita, para que não sofra alterações.

Os tubos com citrato de sódio são utilizados para a realização de estudos da coagulação, onde são determinados maioritariamente o fibrinogénio, o tempo de protrombina, o tempo de tromboplastina parcialmente ativada e o tempo de trombina. Também são determinados os grupos sanguíneos, e feitos os testes de Coombs direto e indireto e dímero-D, que são testes realizados por técnicas manuais. O citrato de sódio possui um mecanismo de ação semelhante ao EDTA, contudo liga-se reversivelmente ao íon cálcio. Após a colheita e a sua triagem, a amostra é centrifugada a 3000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos para a obtenção de plasma, rico em fatores de coagulação e pobre em plaquetas.

Nos autoanalisadores Sysmex XT-2000i e Sysmex XE-2100 é feito o hemograma, onde são contadas as células sanguíneas — eritrócitos, leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos), plaquetas e reticulócitos. São também avaliados os restantes parâmetros hematimétricos como concentração de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VGM), hemoglobina corpuscular média (HGM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHGM) e amplitude de distribuição do tamanho dos glóbulos vermelhos (RDW). As alterações no hemograma são detetadas pelo autoanalisador que alerta para isso e, caso se justifique, é realizado de forma manual um esfregaço sanguíneo de modo a observar a morfologia das células e confirmar os resultados. A HbA1c, hemoglobina glicada, é medida no autoanalisador ADAMS A1c HA-8180V e ADAMS A1c HA-8180T.

Quanto ao estudo da coagulação os testes são realizados no autoanalisador STA Compact Max Systems.

Quando finalizadas as análises requeridas pelo clínico, estas são validadas por técnicos superiores, especialistas, farmacêuticos e médicos através do sistema Apollo.

Deste setor fazem parte quatro técnicos de diagnóstico e terapêutica (TSDT) com a função de coordenação, gestão do CQI e CQE, validação técnica dos resultados e visualização dos esfregaços de sangue periférico, e um farmacêutico especialista em Análises Clínicas.

6.1 Hemograma

O hemograma fornece informação qualitativa e quantitativa acerca dos constituintes celulares do sangue, permitindo o diagnóstico de diversas patologias e a sua monitorização. O hemograma completo é constituído pelo eritrograma, leucograma e plaquetograma. Podem ocorrer alterações no mesmo por diversas causas, tais como: clonais, hereditárias, infecciosas, doenças crónicas, etc. Os valores de referência tabelados para este conjunto de análises podem variar devido, a idade, etnia, condições geográficas, uso de medicamentos, postura, jejum, gravidez, estilo de vida, presença ou ausência de processo infeccioso (4).

6.1.2 Autoanalisador e princípio de funcionamento

No laboratório Avelab existem dois autoanalisadores— SysmexXE2100 e Sysmex-XT2000i, que combinam tecnologia ótica e elétrica e cujo princípio de funcionamento é idêntico.

Muito resumidamente, as células são previamente diluídas e transportadas para a câmara de deteção onde atravessam uma abertura rodeada por dois elétrodos com passagem de corrente elétrica e radiofrequência. Assim, é possível contar e detetar o tamanho das células sanguíneas através de alterações da resistência elétrica. A densidade do interior da célula, como tamanho nuclear é determinada pelas diferenças de resistência de radiofrequência. Estas alterações medidas são expressas em pulsos elétricos, que originam um gráfico citograma que expressa a distribuição do tamanho celular e densidade interna (5).

Quando as células passam através da abertura linearmente alinhadas à frente do detetor, são rodeadas por um fluido que impede o refluxo até voltarem ao tubo coletor. Este reagente aumenta a eficácia do método, uma vez que evita a ocorrência de falsos pulsos elétricos gerados pelo refluxo das células — focagem hidrodinâmica. (5)

A citometria de fluxo (componente ótica) possibilita a análise das características químicas e fisiológicas das células através da análise da dispersão da luz e da intensidade de luz emitida. Esta tecnologia é particularmente útil para a contagem dos leucócitos e contagem diferencial, assim como para a contagem dos reticulócitos e células imaturas.

6.1.3 Eritrograma

O eritrograma avalia os parâmetros qualitativos e quantitativos dos eritrócitos, indica o número de eritrócitos presentes no volume de sangue total, o tamanho médio e a quantidade e concentração médias de hemoglobina presentes. Informa ainda sobre a homogeneidade ou não dos eritrócitos através do índice de distribuição de tamanho dos glóbulos vermelhos (RDW) (10).

Como referido atrás, a contagem e avaliação do tamanho (volume) dos eritrócitos é efetuada por impedância elétrica com focagem hidrodinâmica. (10) Com base nestes parâmetros e no valor da concentração da hemoglobina é possível determinar os índices hematimétricos — Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e Concentração da Hemoglobina corpuscular média (CHCM).

6.1.3.1 Concentração de Hemoglobina

A hemoglobina (Hb), é o elemento essencial dos glóbulos vermelhos, responsável pelo transporte de oxigénio (O_2) dos pulmões para todos os tecidos. Esta molécula é composta por 4 cadeias polipeptídica e 4 grupos heme cada um dos quais tem ligado um átomo de ferro (Fe^{2+}). Um adulto normal tem 3 tipos de hemoglobina que diferem nas cadeias globínicas, a HbA que é constituída por 2 cadeias alfa e 2 cadeias beta ($\alpha_2\beta_2$), a HbF constituída por 2 cadeias alfa e 2 cadeias gama ($\alpha_2\gamma_2$) e a HbA2 constituída por 2 cadeias alfa e 2 delta ($\alpha_2\delta_2$). Durante os primeiros anos de vida, a expressão da HbA aumenta para mais de 95% da composição da hemoglobina, enquanto que a HbF diminui para menos de 1% da composição de Hb. Ao mesmo tempo, os níveis de HbA2 sofrem um leve aumento para 2,5%-3,5%.

A concentração de hemoglobina é também determinada no autoanalisador por espectrofotometria no visível, por um método que utiliza laurilsulfato de sódio (SLS) sem cianeto. O reagente hemolisa os eritrócitos e leucócitos da amostra. A reação química inicia-se com a alteração da globina, oxidando depois o grupo heme. O grupo hidrofílico do SLS pode ligar-se ao grupo heme, formando um complexo corado (SLS-HGB) que é medido através da quantidade de luz absorvida.

6.1.3.2 Hematócrito

O hematócrito indica o volume de eritrócitos num determinado volume de sangue. O seu cálculo corresponde à razão entre o volume dos glóbulos vermelhos e o volume total de sangue. Este parâmetro é expresso sob a forma de razão (L/L) ou em % (14). e contribui para a avaliação da fluidez do sangue, estado de hidratação, monitorização de hemorragia aguda e diagnóstico de anemias, uma vez que se encontra diminuído em situações de microcitose, drepanocitose e esferocitose. Na maioria dos laboratórios, tal como no laboratório Avelab, a sua avaliação é feita diretamente pelo analisador automático, no entanto também é fácil de calcular desde que se conheça o número de eritrócitos presentes num determinado volume de sangue e o seu volume médio (15).

6.1.3.3 Volume Corpuscular Médio

O Volume Corpuscular Médio, VCM, indica o tamanho das hemácias e é expresso normalmente em fentolitros (fl). Permite classificar a anemia em microcítica, normocítica ou macrocítica. (16) É medido diretamente pelo autoanalisador, mas pode ser determinado manualmente desde que se conheça o o número de eritrócitos presentes num determinado volume de sangue e o hematócrito.

6.1.3.4 Hemoglobina Corpuscular Média

A Hemoglobina Corpuscular Média corresponde à quantidade média de hemoglobina presente no glóbulo vermelho. A unidade é o pg (picograma). Este parâmetro não é essencial na classificação das anemias (16).

6.1.3.5 Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média

A Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média CHCM representa a concentração média de hemoglobina em cada glóbulo vermelho. A unidade normalmente usada é g/dL e calcula-se a partir da concentração de hemoglobina e do hematócrito. Este índice permite classificar a anemia em hipocrômica, normocrômica ou hiperocrômica. Os glóbulos vermelhos hipocrômicos são característicos, por exemplo, das anemias por deficiência de ferro (16).

5.1.3.6 Índice de Distribuição de Tamanho dos Glóbulos Vermelhos

O Índice de Distribuição do Tamanho dos Glóbulos Vermelhos (RDW) reflete o grau de heterogeneidade do volume dos glóbulos vermelhos numa determinada amostra e por isso pode ser definido como o índice de anisocitose. Os autoanalisadores para além de determinarem este parâmetro apresentam ainda o tamanho de todos os eritrócitos medidos sob a forma de histograma o que evidencia ainda melhor a presença de anisocitose. Esta determinação é importante no diagnóstico dos diversos tipos de anemia.

Tabela III: Classificação de anemias de acordo com o volume corpuscular médio (VCM) e o índice de distribuição do tamanho dos glóbulos vermelhos (RDW) (Adaptado de: Salvagno et al., 2015)

Valor de RDW	VCM Diminuído	VCM Normal	VCM Aumentado
Normal	Anemia da doença crónica Talassémia heterozigótica	Anemia da doença crónica Anemia hemolítica	Anemia aplástica Doença hepática crónica
Aumentado	Deficiência de ferro Anemia Hemolítica Beta talassémia	Deficiência inicial de ferro Deficiência inicial de folato, vitamina B12 Anemia falciforme	Anemia hemolítica imune Deficiência de folato, vitamina B12 Esferocitose hereditária

6.1.4 Leucograma

O leucograma permite analisar a série branca, constituída pelos leucócitos, nomeadamente a contagem de leucócitos, e a contagem diferencial de leucócitos designadamente neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e monócitos.

6.1.4.1 Contagem de leucócitos

A contagem de leucócitos é expressa em número de células por litro de sangue (10^9 /L) (19). Um número elevado designa-se por leucocitose, contrariamente, um número abaixo do valor de referência designa-se por leucopenia. A leucocitose está normalmente associada a um número elevado de neutrófilos, mas, noutros casos, pode dever-se a um aumento do número de linfócitos e ocasionalmente devido ao aumento de eosinófilos ou

à presença de células mieloides ou linfoides anormais (19). Contrariamente, a leucopenia pode resultar de uma diminuição do número de neutrófilos e/ou linfócitos, maioritariamente (21). No entanto, a interpretação dos resultados obtidos, tanto os valores de leucocitose como de leucopenia não podem ser avaliados sem coordenação com a fórmula leucocitária.

Os neutrófilos são células fagocíticas cujo principal objetivo é destruir microrganismos, diretamente e após terem sido recrutadas para o local de inflamação para fagocitarem agentes patogénicos (22). Existem vários tipos de neutrófilos: segmentados quando o núcleo possui vários lóbulos (2 a 5), unidos por filamentos, fibras de heterocromatina densa envolvida pela membrana nuclear (22) e encontram-se aumentados em diversos estados patológicos; em banda, são células menos diferenciadas, ou mais imaturas que, quando em número elevado se denomina como desvio à esquerda (19). Este desvio ocorre em situações como a reação leucemoide, e a leucemia mieloide crónica (LMC) e, por esse motivo, as patologias podem ser confundidas. Para o esclarecimento de uma ou outra os neutrófilos fornecem um dado importante; na LMC ocorre um aumento das células imaturas com picos dos estágios de mielócitos e neutrófilos segmentados, enquanto na reação leucemóide ocorre uma progressão ordenada dos estágios de maturação sem ocorrer picos de um estágio particular (23).

Os linfócitos possuem um diâmetro de 12 a 18 μm com um núcleo redondo ou oval que possui uma cromatina condensada com uma ocasional presença de nucléolos. O citoplasma é escasso a moderado com uma coloração azul claro e eventual presença de vacúolos (23). Um aumento na contagem de linfócitos é chamado linfocitose, maioritariamente associado a infeções virais, e podem apresentar uma morfologia característica. Uma contagem baixa de linfócitos designa-se de linfopenia, e é frequentemente associada a terapia com fármacos ou imunodeficiência. Os linfócitos também estão implicados na leucemia; A leucemia linfocítica crónica é a mais prevalente em pessoas com mais de 65 anos, enquanto que a leucemia linfoblástica aguda é a forma mais comum de leucemia infantil. Quando os linfócitos respondem a infeções virais ou outros estímulos imunológicos ocorrem alterações morfológicas que os tornam linfócitos reativos (22). Nesta circunstância os linfócitos adquirem maiores dimensões (10 a 30 μm), com as mais variadas formas, núcleo irregular e cromatina fina e mais dispersa (23).

Os eosinófilos são células com um diâmetro entre 12 e 17 μm , com grânulos citoplasmáticos maiores que os do neutrófilo e núcleo também polilobulado (19). Os

grânulos contêm histamina, que muitas vezes sinaliza uma resposta a alergias, podendo penetrar em exsudatos inflamatórios (19) ou infecções parasitárias. (22). Possuem fraca capacidade fagocítica.

Os monócitos possuem um diâmetro de 12 a 20 μm com um núcleo de formas variadas e sem nucléolos visíveis. O citoplasma possui numerosos grânulos finos. Os monócitos quando passam para os tecidos designam-se por macrófagos. Os macrófagos são o tipo de célula mais abundante. Têm um papel importante na fagocitose de partículas estranhas ao organismo e na resposta imunológica através da apresentação de epítomos. Um aumento do número de monócitos designa-se de monocitose.

6.1.5 Plaquetograma

As plaquetas são células que provém dos megacariócitos da medula óssea. Estas desempenham um papel importante no processo hemostático, participam no processo de coagulação e mantêm a integridade dos capilares. A análise das plaquetas permite identificar situações de trombocitose, caracterizadas por um aumento do número de plaquetas, ou de trombocitopenia, definida por um número reduzido de plaquetas. A trombocitopenia constitui a anormalidade plaquetária mais comum, e pode resultar de uma diminuição da produção de plaquetas por trombopoiese ineficaz; do aumento da sequestração esplénica ou da destruição aumentada. A trombocitose pode ser de origem primária ou secundária. A trombocitose primária pode ocorrer em casos de síndromes mieloproliferativas, principalmente na trombocitose essencial. A trombocitose secundária pode ser devida a doenças inflamatórias e infecciosas, e após hemorragias. (35)

As plaquetas podem apresentar alterações de tamanho: plaquetas grandes designadas macro trombócitos, e plaquetas muito grandes chamadas plaquetas gigantes. A agregação plaquetar pode ocorrer devido à agregação das plaquetas na presença de anticoagulantes, sendo o mais comum o EDTA. O satelitismo plaquetar é outro fenómeno induzido através do fator plasmático, normalmente IgG ou IgM, que provoca a adesão das plaquetas à superfície dos neutrófilos. A falha no reconhecimento destas alterações leva a contagens diminuídas, que podem resultar em diagnósticos errados e tratamento inadequado (35).

O autoanalisador faz a contagem das plaquetas por impedância elétrica conjuntamente com os glóbulos vermelhos tal como referido atrás, mas também por citometria de fluxo (contagem ótica fluorescente) o que aumenta a exatidão do resultado

sobretudo na presença de elevado número de fragmentos eritrocitários ou plaquetas gigantes.

6.2 Esfregaço de sangue periférico

No laboratório Avelab o esfregaço de sangue é realizado manualmente, as células são coradas pela coloração de May-Grunwald-Giemsa e observadas ao microscópio ótico na objetiva de 100x com óleo de imersão. A observação ao microscópio permite a avaliação da morfologia e características celulares, levando a um melhor diagnóstico, nomeadamente após a deteção de anomalias no hemograma realizado no analisador automático.

A trombocitopenia é um exemplo de uma anomalia que deve ser confirmada no esfregaço de sangue periférico, pois pode tratar-se de pseudotrombocitopenia devido a agregação plaquetar, ou presença de plaquetas gigantes. A leucocitose, linfocitose e monocitose, bem como alertas da presença de blastos ou linfócitos atípicos são outras anomalias que requerem a avaliação do esfregaço de sangue periférico (25).

Caso a amostra do utente apresente valores com desvios ou alterações aos critérios pré-estabelecidos pelo laboratório faz-se uma comparação com a história clínica e se existir uma concordância procede-se à validação.

6.3 Coloração May-Grunwald-Giemsa

Esta coloração permite a visualização dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas. O mecanismo baseia-se na afinidade dos corantes para as estruturas celulares de acordo com o pH. A eosina (corante ácido) cora os componentes básicos das células como o citoplasma e grânulos, enquanto o azul de metileno (corante básico) cora os componentes ácidos como ácidos nucleicos e proteínas do núcleo (26). Os grânulos dos basófilos contêm heparina que tem afinidade para o corante básico corando de roxo escuro; os grânulos dos eosinófilos contêm um derivado de espermina com um grupo alcalino que cora com a eosina apresentando uma cor vermelho-alaranjado; os grânulos dos neutrófilos possuem um conteúdo com pH neutro e, assim sendo, coram com ambos os corantes adquirindo uma tonalidade violeta (26).

6.4 Alterações eritrocitárias

A observação do esfregaço de sangue é igualmente importante para o reconhecimento de alterações dos eritrócitos. As principais alterações eritrocitárias são as alterações da forma, tamanho, coloração, presença de inclusões e alterações na distribuição das células no esfregaço (27).

6.4.1 Tamanho dos eritrócitos

De acordo com o tamanho os eritrócitos podem ser classificados como normocíticos, com um diâmetro médio de 7,2 μm com uma variação de 6,8 a 7,5 μm , macrocíticos ($> 8,2 \mu\text{m}$) tamanho superior ao normal ou microcíticos tamanho inferior ao normal ($< 6,2 \mu\text{m}$) (27). O aumento da variabilidade de tamanhos dos glóbulos vermelhos, além do esperado para um indivíduo saudável normal, designa-se de anisocitose e aparece espelhado no RDW, como referido anteriormente. Este índice não é específico porque não indica o tipo de variação presente, mas encontra-se presente em distúrbios hematológicos. Quando num resultado ocorre um aumento da distribuição do tamanho dos glóbulos vermelhos (RDW) é indicativo de anisocitose (25).

A macrocitose tem como principais causas o defeito na maturação nuclear associado à deficiência de vitamina B12 ou folato ou estimulação aumentada da eritropoietina. Esta última pode levar à libertação prematura de reticulócitos no sangue, verificando-se a presença de células macrocíticas e ligeiramente hipocrómicas responsáveis pelo aumento do VCM no hemograma (27).

A microcitose relaciona-se com a diminuição da síntese de hemoglobina associada a anemia por deficiências de ferro, síndrome de mal absorção e hemoglobinopatias, ou seja, uma síntese de globina alterada ou anormalidade mitocondrial que afete a síntese do grupo heme. No hemograma aparece uma diminuição do VCM na microcitose generalizada (27).

6.4.2 Alterações na forma dos eritrócitos

A alteração da forma dos eritrócitos maduros designa-se de poiquilocitose. Esta anormalidade pode resultar de uma produção de células anormais pela medula óssea (devido a alterações físicas ou químicas da membrana celular ou alteração do conteúdo de hemoglobina) ou danos provocados nas células normais após a sua libertação para a corrente sanguínea (27). Assim, os eritrócitos podem apresentar diversas formas, tais como:

- **acantócitos** são eritrócitos que apresentam espículas irregulares na membrana celular, e ocorrem maioritariamente na abetalipoproteinémia devido à diminuição de lípidos no plasma com perda da integridade da membrana celular e na anemia hemolítica associada a cirrose alcoólica (27).

- **eliptócitos** são eritrócitos em forma de charuto associados a perda de integridade da membrana celular devido a condições como eliptocitose hereditária, anemias associadas a malignidades, anemia por deficiência de ferro, anemia perniciosa, e talassémia (27).

- **codócitos** são eritrócitos com aparência de células em alvo, cuja presença pode estar relacionada com talassémias, distribuição anormal da hemoglobina, hemoglobinopatias, anemias hemolíticas, doença hepática, anemia por défice de ferro (27).

6.4.3 Coloração dos eritrócitos

A coloração dos eritrócitos depende da concentração de hemoglobina. Os eritrócitos normocrómicos apresentam coloração rosada com centro ligeiramente mais claro. A variação da coloração eritrocitária é designada de anisocromia. A hipocromia ocorre quando a região mais clara do eritrócito excede um terço da célula, associado a diminuição da síntese de hemoglobina como na anemia por défice de ferro (27).

6.4.4 Alterações na distribuição dos eritrócitos

Por vezes não se consegue uma boa distribuição das células no esfregaço e ao microscópio verifica-se a presença de agregados designados de rouleaux. Este fenómeno de rouleaux é observado nas áreas mais finas do esfregaço indicando aumento de proteínas como imunoglobulinas, autoanticorpos ou fibrinogénio. Estes podem ocorrer

em infecções, doenças hepáticas crônicas e menos frequentemente mielomas ou macroglobulinemia (30).

6.5 Velocidade de Sedimentação

A velocidade de sedimentação, VS, permite a detecção e monitorização da atividade inflamatória que pode estar associada a doenças autoimunes, tumores ou infecções. Contudo, esta análise não é específica nem tem significado clínico quando realizada isoladamente, é necessário que sejam efetuadas análises a outros parâmetros para permitir, um diagnóstico correto. O aumento da VS pode também ocorrer em situações fisiológicas como na gravidez e no envelhecimento (18).

A determinação da velocidade de sedimentação no laboratório Avelab é realizada no equipamento automatizado Ves-Matic 30 Plus da Menarini (em anexoI). A amostra de sangue total colhida no tubo com EDTA é aspirada para um capilar onde ocorre a sedimentação com a formação de agregados de eritrócitos. A leitura da sedimentação é automática através de um sensor ótico-eletrónico através da fotometria de infravermelhos a um comprimento de onda de 950 nm, em intervalos de tempo precisos. Os impulsos elétricos são diretamente proporcionais à concentração de GV presentes no capilar, que são captados por um fotodetector, obtendo-se assim uma curva de sedimentação para cada amostra. A utilização de raios infravermelhos evita interferências causadas pela presença de lípidos ou bilirrubina nas amostras.

Os valores obtidos são convertidos em valores comparáveis com o método de *Westergreen* (método de referência) mas com maior sensibilidade e especificidade e o uso de menos amostra.

6.6 Quantificação de variantes da hemoglobina

As variantes da hemoglobina normalmente detetadas e quantificadas são a hemoglobina glicada (HbA1c), a hemoglobina F (HbF) e a hemoglobina A2 (HbA2).

A determinação da hematologia tem particular interesse a quantificação das hemoglobinas F e A2, assim como de outras eventuais variantes, na medida em que podem ser auxiliares importantes de patologias genéticas da hemoglobina.

A determinação da hemoglobina glicada é uma análise muito requisitada para o diagnóstico e controlo da diabetes e diagnóstico da pré-diabetes em adultos e é realizada

no autoanalisador ADAMS A1c HA-8180V (Anexo) cujo princípio de funcionamento é a Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) com detecção a dois comprimentos de onda 420 e 500 nm. Este autoanalisador tem a capacidade de quantificar não só a HbA1c como também a HbF e a HbA2 e sinaliza ainda picos anormais correspondentes a hemoglobinas anormais.

No contexto da hematologia tem particular interesse a quantificação das hemoglobinas F e A2, assim como de outras eventuais variantes, na medida em que podem ser auxiliares importantes de patologias genéticas da hemoglobina.

Existem dois grupos de distúrbios genéticos da hemoglobina: hemoglobinopatias e talassémias. As hemoglobinopatias resultam de mutações pontuais nas cadeias globínicas α e β , com substituição de um aminoácido por outro. As talassémias resultam de um desequilíbrio das cadeias globínicas devido à síntese reduzida ou ausência de síntese das cadeias normais. (34) A quantificação das frações normais da Hb A, HbA2, e HbF e a detecção de variantes de hemoglobinas (S, C, E e D) permitem a identificação destas patologias.

6.7 Testes da Coagulação Sanguínea

A cascata da coagulação é um modelo que explica a fisiologia da coagulação do sangue, que consiste na ativação sequencial de enzimas que resulta na formação de trombina, que converte o fibrinogénio em fibrina (39). O processo de coagulação é experimentalmente dividido na via intrínseca ou de contacto, iniciada através de componentes intrínsecos do espaço intravascular, e pela via extrínseca, que depende do fator tecidual e ativada aquando da lesão vascular (39). No entanto, esta divisão é apenas prática, de forma a identificar os fatores responsáveis, porque “in vivo” não existe esta separação, mas sim, uma sequenciação de acontecimentos. É importante referir que valores baixos de fatores da coagulação se podem dever a uma menor síntese, pelo que, estes testes também podem servir como uma avaliação da função hepática (38).

Os testes de coagulação propostos em laboratório são o tempo de protrombina (PT), tempo de tromboplastina parcialmente ativada (aPTT) e tempo de trombina (TT), para além da quantificação do fibrinogénio e dímeros-D. Estes testes são efetuados automaticamente, após centrifugação da amostra (plasma), no autoanalisador STA Compact Max Systems.

6.7.1 Tempo de Protrombina

O tempo de protrombina avalia a via extrínseca da cascata da coagulação, assim como a via comum. Reflete alterações em três dos fatores (fator II, VII e X) dependentes da vitamina k, fibrinogénio e fator V. É um parâmetro utilizado na monitorização de anticoagulantes orais, como o varfine (38). Este teste consiste em adicionar ao plasma proveniente de sangue colhido para tubo com citrato o reagente de tromboplastina, constituído pelo fator tecidual e cálcio, avaliando-se de seguida o tempo de coagulação, ou seja, o tempo que decorre até à formação do coágulo. Para minimizar a discrepância dos resultados do PT foi criada uma referência internacional denominada de razão internacional normalizada (INR), que se traduz na razão entre o PT do paciente e o PT de um plasma de referência, em segundos. (39). Um INR aumentado pode refletir a deficiência dos fatores I, II, V, VII e X, deficiência de vitamina k, terapêutica com alguns anticoagulantes orais, doença hepática, síndrome nefrótica. O INR pode encontrar-se diminuído em estados pró-trombóticos, nomeadamente no pós-operatório (39).

6.7.2 Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada

O APTT avalia a via intrínseca da cascata da coagulação, assim como a via comum. Reflete alterações dos fatores XII, XI, IX e VIII e da via comum, X, V, II e fibrinogénio (39). Além da deficiência destes fatores, também é utilizado na deteção de anticoagulante lúpico, assim como na monitorização da terapêutica com heparina. Este parâmetro pode estar aumentado na deficiência dos fatores I, II, V, VIII, IX, X, XI, XII, doença hepática, coagulação intravascular disseminada ou terapêutica com heparina, e estar diminuído num estado de hipercoagulabilidade (39). O aPTT relaciona-se com outros parâmetros avaliados clinicamente como o fibrinogénio e Dímeros-D. O fibrinogénio é uma proteína de fase aguda pelo que se encontra aumentada nos processos inflamatórios. Um valor elevado deste implica potencial elevado para a formação de fibrina, pelo que o risco trombótico é maior. Contrariamente, um valor baixo, pode refletir doença hepática ou coagulação intravascular disseminada. (38). Os Dímeros-D são produtos de degradação da fibrina (PDF) e a sua determinação tem interesse no diagnóstico de quadros trombóticos, apresentando um aumento na presença de trombos. Este parâmetro é reconhecido como o marcador mais específico de trombose e fibrinólise fisiológica, sendo clinicamente usado para exclusão diagnóstica de eventos tromboembólicos (38). Um

valor normal não elimina a possibilidade de uma patologia e risco trombótico. Além de trombose e tumores, aumenta em situações de inflamação, trauma e cirurgia.

6.7.3 Tempo de Trombina

O tempo de trombina (TT) é o tempo de conversão do fibrinogénio em fibrina, após adição de trombina, terminando com a formação do coágulo. É um parâmetro que reflete a quantidade de fibrinogénio, aplicado em contexto de monitorização de anticoagulantes (39). Poderá estar aumentado face a inibidores da trombina, como por exemplo a terapêutica com heparina, um fibrinogénio disfuncional ou perante um aumento dos produtos de degradação da fibrina (39). No seguimento dos testes de coagulação abordados anteriormente, e respetivas determinações sequenciais, são também determinadas a proteína c, proteína s e antitrombina.

6.8 Equipamento STA Compact Max Systems

O autoanalisador automático STA Compact Max Systems realiza as várias análises e funciona com um sistema de cuvetes que contêm uma esfera metálica, que é induzida a oscilar para medir o tempo de coagulação. Este é medido através da deteção da amplitude de oscilação da esfera pelo método cronométrico. Neste sistema não interferem amostras hemolisadas, ictéricas e lipémicas. (39).

6.9 Outras determinações analíticas

Com muito menos frequência do que o hemograma ou a velocidade de sedimentação são efetuadas outras determinações analíticas que eu tive a possibilidade de acompanhar e que são realizadas por técnicas manuais.

6.10 Teste direto da Atiglobulina

Usa-se o teste direto de antiglobulina (Coombs direto) para detetar a presença de anticorpos contra os eritrócitos circulantes e que estão ligados a antigénios de superfície dos glóbulos vermelhos. Os eritrócitos do paciente são incubados com o reagente antiglobulina humana e se os eritrócitos tiverem anticorpos ligados ocorre aglutinação — que configura resultado positivo. Um resultado positivo indica a presença

de autoanticorpos nos eritrócitos. Um falso positivo pode ocorrer e nem sempre equivale à hemólise. Portanto, os resultados devem estar correlacionados com os sinais e sintomas clínicos. (37).

6.11 Teste de Coombs Indireto

Utiliza-se o teste indireto da antiglobulina humana (teste de Coombs indireto) para detecção de anticorpos no soro de um paciente. O soro é incubado com eritrócitos de antigenicidade conhecida e posteriormente adiciona-se o soro de Coombs (antiglobulina humana). Se ocorrer aglutinação significa que os anticorpos (anticorpos auto ou aloanticorpos) contra eritrócitos estão presentes no soro do indivíduo. Este teste é também utilizado na determinação da especificidade de um aloanticorpo, geralmente é solicitado em situações de transfusão, para confirmação de testes negativos, etc. (36)

6.12 Determinação de Grupos Sanguíneos

O sangue humano é classificado em grupos de acordo com a presença de antígenos específicos na membrana dos eritrócitos. Este conhecimento é essencial na realização de transfusões sanguíneas, transplantes de órgãos e também nas grávidas.

Existem vários sistemas de classificação, mas os mais relevantes são o sistema ABO e o sistema Rhesus (Rh). O sistema ABO refere-se a um conjunto de antígenos que podem estar ou não presentes na membrana dos glóbulos vermelhos. O aparecimento dos antígenos ABO, e de outros antígenos eritrocitários, resulta da expressão de genes herdados dos progenitores que definem um determinado fenótipo, que neste caso pode ser A, B, AB ou O. Os anticorpos deste sistema, anti-A e anti-B, estão normalmente presentes nos soros de indivíduos que não têm os antígenos correspondentes na superfície dos seus eritrócitos. Estes anticorpos são imunoglobulinas do tipo IgM aglutinantes, não atravessam a placenta, reagem à temperatura do organismo, à temperatura ambiente ou a temperaturas baixas (anticorpos “frios”) aglutinando os eritrócitos (37).

Os antígenos do sistema Rhesus localizam-se também na membrana dos eritrócitos, sendo os mais comuns o C, D, E, c e e. O antígeno imunogénico é o D, sendo

também o mais comum na população. Cerca de 85% da população apresenta o antígeno D, e nesse caso são considerados indivíduos com sangue Rh(D)+. Os restantes 15% da população não possuem este antígeno e são Rh negativo (37).

No AVELAB a determinação é manual como já referido, ou seja, esta prova consiste na adição às células do utente de anti-soros comerciais anti-A, anti-B e anti-D em 3 lâminas distintas. A mistura reage à temperatura ambiente e a obtenção ou não de aglutinação visível, conforme o tipo de célula e anticorpo conhecido, permite classificar o sangue do utente. Os grupos Rh negativos e os AB precisam de confirmação. Para tal, utilizam-se células lavadas do paciente, adiciona-se reagente de Bliss e coloca-se em banho maria. Ao fim de 30 minutos volta-se a lavar as células com soro, retira-se o sobrenadante e suspendem-se os eritrócitos. A suspensão é vista ao microscópio com soro de Coombs e se não ocorrer aglutinação, dá-se como confirmado o grupo sanguíneo (37).

6.13 Caso Clínico

Sexo: Feminino, 88 anos de idade

Tabela IV: Hemograma

Parâmetros analíticos	Valores obtidos	Valores de referência
WBC	4,88 ($10^{12}/L$)	4,5-5,5 ($10^{12}/L$)
HGB	8,9 (g/dl)	12-15 (g/dL)
HCT	28,5 (%)	36-46 (%)
VCM	82,4 (fL)	83-101 (fL)
HCM	25,7 (pg)	27-34 (pg)
CHCM	31,2 (g/dL)	31,5-34,5 (g/dL)
PLT	359 ($10^3/uL$)	(150-400 $10^9/L$)
RDW-CV	22,5 (%)	(11,5-14,5 %)
NEUT	3,64 ($10^9/L$)	(1,5-6,9 $10^9/L$)
LYMPH	0,94 ($10^9/L$)	(1,5-4 $10^9/L$)
MONO	0,27 ($10^9/L$)	(5,5 $10^9/L$)
EO	0,03 ($10^9/L$)	(<0,4 $10^9/L$)
BASO	0,00 ($10^9/L$)	(<0,1 $10^9/L$)

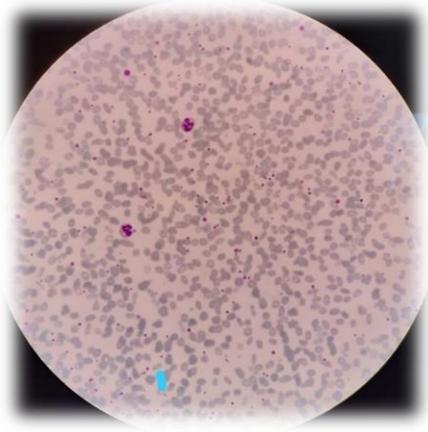


Figura 2: Observação ao microscópio de esfregaço sanguíneo, sem e com ampliação

No eritrograma podemos verificar que o valor de hemoglobina se encontra abaixo do valor de referência o que significa que estamos perante uma anemia. O valor de MCV também se encontra diminuído o que indica que esta anemia é microcítica, ou seja, os eritrócitos têm um tamanho menor que o devido. Também se verifica uma diminuição no MCHC, o que indica hipocromia, ou seja, os eritrócitos estão descorados. Por último verificamos um aumento no valor plaquetar, o que indicia que a anemia se pode dever se a deficiência de ferro. Foi realizado o esfregaço sanguíneo onde podemos verificar, a hipocromia dos eritrócitos, elevado volume plaquetar e neutrófilos em bastão (Figura2).

Relativamente a outros parâmetros que foram analisados, pudemos verificar um valor da proteína c reativa, de 92.3mg/L, sendo o valor de referência inferior a 50mg/L. O valor desta proteína aumenta em casos de inflamação, pelo que não é específica. Apenas indica que existe a presença de um processo inflamatório. Foi também avaliada a creatina cinase que se encontrava dentro da gama de referência.

Para termos um diagnóstico mais correto seria necessário a avaliação de outros parâmetros, tais como ferritina, ferro sérico, capacidade de fixação de ferro.

Assim, as principais causas que poderão estar subjacentes a esta anemia são: perdas de sangue, dieta pobre, presença de condição sistémica subjacente, intoxicação por chumbo.

7.MICROBIOLOGIA

A microbiologia é a área da ciência que estuda a biologia de vários microrganismos tais como bactérias, vírus, parasitas e fungos. Alguns coabitam com as células humanas, no entanto, a baixa imunidade, barreiras físicas destruídas ou efeitos secundários podem tornar mais propícia a ocorrência de processos patológicos. Num laboratório de microbiologia, de modo geral, os agentes microbianos causadores de patologias são isolados, identificados e determinadas as sensibilidades e resistências a antibióticos de modo a adequar a terapia.

A receção das amostras é efetuada num compartimento designado por “setor das urinas”, onde é feita a leitura do código de barras e impressão de etiquetas, para posterior identificação de lâminas e meios de cultura, através do software Apollo. Posteriormente, realiza-se também a impressão da folha de trabalho para cada amostra biológica onde são descritos todos os processamentos efetuados, acompanhados da data da sua realização. Além disto, é verificado o acondicionamento das amostras, bem como a sua identificação com etiqueta associada, que contém nome do utente e número mecanográfico interno e o volume, no caso de uma amostra de urina de 24h,12h. Caso algum destes parâmetros não se encontre em concordância com as regras de boas práticas, a amostra é rejeitada e é pedida uma nova amostra. É dada a entrada de cada amostra individualmente no sistema Apollo onde começam a ser rastreadas. As amostras de urina são divididas por setores conforme as análises requisitadas. Relativamente às outras amostras são colocadas em tabuleiros e seguem para análise, pois a sua análise é mais específica.

Atendendo ao tipo de amostra realizam-se para além do exame direto, exame bacteriológico, micológico e parasitológico. A identificação presuntiva dos microrganismos é efetuada através das características observadas no exame direto, exame cultural, realização de provas bioquímicas manuais, bem como identificação e testes de suscetibilidade a antibióticos realizados no autoanalisador Phoenix. As amostras mais frequentes são urina, fezes, exsudatos vaginais, purulentos, da orofaringe e expetoração. Além disso, realiza-se a pesquisa de antigénios de *Helicobacter Pylori*, adenovírus e rotavírus em amostras de fezes e pesquisa de *Streptococcus* do grupo A em amostras de exsudatos da orofaringe e nasofaringe, raspados de unhas e cabelos, entre outros.

7.1 Urina

A amostra de urina é uma amostra estéril exceto quando se encontra contaminada com flora comensal ou infecção do trato urinário. Assim, a colheita da amostra de urina deve ser realizada em condições assépticas, após higiene prévia da região genital, rejeição do primeiro jato e colheita do jato intermédio (41,42). Quando existe contaminação da amostra é observada a presença de microrganismos pertencentes à microbiota do períneo, próstata, uretra ou vagina, podendo ser necessária nova colheita da amostra. Os agente etiológicos mais frequentemente associados a estas infeções são *Echerichia coli*, *Klesiella Enterobacter* e *Proteus spp*. Em doentes com algaliação permanente e patologias do trato urinário os agentes etiológicos mais comuns são os seguintes, *Pseudomonas spp*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Enterococcus spp* e fungos (41,42).

As amostras dão entrada no laboratório de microbiologia com indicação para a realização de sumária de urina e urocultura ou apenas um dos procedimentos. No primeiro caso, são submetidas, em primeiro lugar, a análise bioquímica no autoanalisador Aution Max AX-4030. Caso não haja deteção de sinal de infeção, a amostra é arquivada e é dado o resultado como negativo. Caso o autoanalisador detete possível infeção, a amostra é centrifugada e segue para análise do sedimento urinário ao microscópio numa ampliação de 100x para visualização das células epiteliais e na de 400x para visualização dos restantes parâmetros.

O exame bacteriológico é o exame mais comum, que engloba vários procedimentos desde a observação morfológica das bactérias, a fresco e após coloração de Gram, o isolamento bacteriano em meios de cultura adequados, identificação através do autoanalisador Phoenix, e posterior teste de sensibilidade a antibióticos, em determinados casos.

7.1.2 Exame Macroscópico

O exame macroscópico, é a primeira etapa do exame bacteriológico, consiste na observação a olho nú das características da amostra, como por exemplo a cor, turvação, consistência, existência de muco ou sangue permitindo assim uma melhor escolha dos métodos para o procedimento seguinte e diagnóstico final (46).

7.1.3 Exame Microscópico Direto

7.1.3.1 Exame a Fresco

O exame a fresco é realizado sem a adição de nenhum reagente ou corante. É executado através da observação microscópica de uma gota da suspensão do material biológico (sedimento) depositada entre lâmina e lamela. Este exame permite a avaliação da qualidade da colheita através da contagem diferencial de células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, identificação de cristais e observação de bactérias (raras ou muito raras). A presença de elevado número de células epiteliais e cultura polimicrobiana sugerem contaminação com a flora comensal, assim como, quando, o número de células epiteliais por campo é superior a 10- 25, com ou sem presença de flora microbiana. (41). Em relação à contagem de leucócitos, uma contagem superior a 10 células por campo, é definida como piúria (indicativo de infecção) e procede-se à realização da coloração de Gram do sedimento urinário para contagem semi-quantitativa de microrganismos, e identificação da sua morfologia nomeadamente cocos, bacilos, cocobacilos, Gram positivos ou negativos e classificação em raros, alguns, frequentes ou muito frequentes.

7.1.4. Coloração de Gram

A Coloração de Gram é a coloração mais utilizada na identificação das diversas bactérias e deve ser realizada em amostras onde existe uma suspeita de infecção. Baseia-se nas diferenças de permeabilidade da parede bacteriana. As bactérias designadas de Gram positivas devido ao seu teor elevado em peptidoglicanos e ácidos teicóicos resistem à descoloração alcoólica retendo o primeiro corante cristal violeta (42). As bactérias Gram negativas, contrariamente possuem uma parede celular constituída por uma camada fina de peptidoglicanos, e bicamada fosfolipídica assimétrica, o que os torna suscetíveis à descoloração alcoólica, e desta forma perdem o complexo cristal violeta-lugol, retendo o

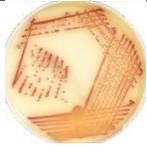
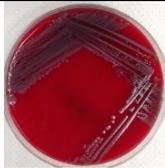
segundo corante a fuscina (41). Permite a identificação da morfologia das bactérias presentes cocos, bacilos ou cocobacilos, assim como a sua classificação em bactérias Gram positivas ou Gram negativas e agrupamento (como por exemplo estafilococos ou estreptococos). Facilita ainda a escolha dos meios de cultura e a seleção das provas de identificação a realizar (45,46).

Também é possível observarem-se fungos, tanto a sua forma leveduriforme como a filamentosa, que se apresentam corados de roxo. No entanto, é importante salientar que estes microrganismos não podem ser classificados de Gram positivos ou Gram negativos. Este tipo de coloração para leveduras é muito útil, na medida em que auxilia na distinção de artefactos existentes nas amostras biológicas. O procedimento a realizar para esta coloração é o seguinte, fixação do esfregaço à chama, incubação de 1 minuto com violeta de genciana, lavagem, descoloração com álcool-acetona, incubação de 1 minuto com carbol fuscina, lavagem e secagem na estufa.

7.1.5 Exame Cultural

Este exame consiste em promover o crescimento das bactérias e isolá-las, de modo a obter quantidade suficiente da bactéria clinicamente relevante e, posteriormente, proceder à sua identificação. Para tal são utilizados meios de cultura que fornecem todos os nutrientes necessários, do ponto de vista metabólico, à proliferação e desenvolvimento das bactérias (45,51) Neste laboratório são utilizados três tipos de meios: meios de enriquecimento, diferenciais e seletivos. Os meios de enriquecimento possuem nutrientes específicos para determinadas bactérias patogénicas, favorecendo o seu crescimento. Os diferenciais potenciam o crescimento das colónias, permitindo a sua diferenciação visualmente. Os seletivos possuem agentes inibitórios específicos para a maioria dos micro-organismos (49). Para a escolha do meio de cultura adequado é necessário ter em conta a amostra, morfologia, agrupamento e observação do exame microscópico. Em relação ao crescimento existem vários fatores que podem influenciar, tais como, temperatura, pH, percentagem de CO₂, etc. A maioria dos micro-organismos patogénicos crescem a uma temperatura compreendida entre os 35°C e 37°C, num ambiente atmosférico normal. Para o desenvolvimento de micro-organismos, os meios inoculados são colocados numa estufa a 36°C. Quando existe suspeita de presença de *Neisseria Gonorrhoeae* ou *Streptococcus pneumoniae* é extremamente importante que estas sejam incubadas a 5-10% de CO₂, pois são espécies fastidiosas. Esta condição é conseguida através da técnica da vela. O tempo médio de incubação é de 18-24h.

Tabela V: Meios de cultura e as suas características

Sementeiras	Meios de cultura	Característica do meio
	Levine	Meio seletivo e diferencial para bacilos entéricos fermentadores e não fermentadores da lactose.
	Gelose CLED	Meio diferencial para microrganismos fermentadores e não fermentadores de lactose.
	Manitol salgado	Meio seletivo para <i>Staphylococcus</i> spp. e identificação presuntiva de <i>Staphylococcus aureus</i> .
	Chromo MRSA SMART	Meio seletivo para <i>Staphylococcus aureus</i> e diferencial para meticilina resistentes ou não resistentes.
	Chromo ID StreptoB	Meio cromogéneo seletivo para <i>Streptococcus</i> do grupo B.
	Sabouraud com cloranfenicol	Meio de isolamento para fungos leveduriformes e filamentosos com inibição de crescimento bacteriano.
	Gelose de Sangue	Meio enriquecido e diferencial para microrganismos com necessidades nutricionais específicas.
	PVX (Gelose de Chocolate)	Meio que favorece o crescimento de <i>Haemophilus</i> spp. e <i>Neisseria</i> spp
	Salmonella-Shigella agar (SS)	Meio seletivo e diferencial para <i>Salmonella</i> spp. e <i>Shigella</i> spp.

	<p>Chromo agar Orientation</p>	<p>Meio cromogéneo para diferenciação de bactérias patogénicas do trato urinário.</p>
	<p>Mueller-Hinton</p>	<p>Meio usado para realização de TSA por método de difusão em disco.</p>
	<p>Candida Select</p>	<p>Meio cromogéneo seletivo e diferencial para leveduras. Diferenciação direta entre <i>Candida albicans</i> e outras espécies patogénicas de leveduras.</p>
	<p>Campylosel</p>	<p>Meio seletivo para <i>Campylobacter</i> spp. em amostras de fezes.</p>
	<p>Columbia</p>	<p>Meio seletivo para bactérias Gram positivas.</p>
	<p>Caldo TODD</p>	<p>Meio de enriquecimento para isolamento de <i>Streptococcus agalactiae</i> em exsudados vaginais/retais e inibição da flora comensal.</p>
	<p>Caldo de Selenito</p>	<p>Meio de enriquecimento para <i>Salmonella</i> spp.</p>

Para o exame cultural da urina retira-se uma alíquota da amostra, previamente homogeneizada, com ansa calibrada de 1µl e através da técnica da sementeira quantitativa semeia-se em quatro quadrantes do meio cromogéneo para isolamento CPS, e incuba-se a 37°C, por 18-24h. Este método permite a sucessiva diluição dos microrganismos presentes na amostra, sendo que o número de micro-organismos pode ser classificado em 4+, 3+,2+ ,1+ consoante o crescimento que ocorreu no último quadrante (43). Na presença de cocos em cacho Gram positivo é utilizado o meio manitol salgado, cocos em cadeia Gram positivo utiliza-se o meio STREP B e diplococos Gram negativo são inoculados no meio CLED e gelose de chocolate. Na presença de fungos leveduriformes ou hifas realiza-se exame cultural em Sabouraud. Caso neste sejam identificadas colónias sugestivas de *Candida Albicans*, efetua-se a repicagem para meio CandiSelect, que permite a identificação de *Candida Albicans*, colónias rosa-arroxeadas. No caso de aparecerem colónias azul-verde intenso, indicam *Candida tropicalis* colónias azul-verde pálido, *Candida glabrata*.

O meio cromogénico CPS da bioMérieux permite a identificação de agentes patogénicos urinários como *E.coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus spp.*, e identificação presuntiva de *Klebsiella pneurnoniae*, *P. aeruginosa*, *Stahpylococos aureus*, *S. agalactiae*, e *Candida spp*(41) e outros micro-organismos, constituindo uma das vantagens da utilização deste meio na identificação dos micro-organismos acima descritos através da coloração e morfologia das colónias. Além disso, permite a distinção entre colónias clinicamente significativas e contaminantes, melhorando a capacidade de isolamento de vários patogénicos urinários, pois inibe o crescimento de flora periuretral, reduzindo o número de amostras classificadas como clinicamente não significativas ou contaminadas. Uma das desvantagens é não ser recomendado para o isolamento de *S.agalactiae* em amostras de urina, devido a inconsistências detetadas (44).

Nas uroculturas devemos valorizar Enterobactereaceae, Pseudomonaceae, Enterococcus, Streptococcus agalactiae, Staphylococcus aureus, Staphylococcus saprophyticus(41,42). As infeções do trato urinário são causadas normalmente por até dois agentes etiológicos, ou seja, dimorfismo, sendo que polimorfismos bacterianos com presença de mais de três espécies é considerado contaminação (41).

7.2 Fezes

Para o exame bacteriológico das fezes devem ser colhidas até 3 amostras em dias diferentes com tamanho aproximado de uma noz e se possível colher porção com muco, pus ou sangue (42). São utilizadas mais do que uma amostra, para aumentar a capacidade de recuperação de microrganismos, devido à sua liberação nas fezes poder ser intermitente (43).

7.2.3 Exame Direto

O processamento da amostra de fezes inicia-se com a observação macroscópica da mesma, com descrição das características visíveis a olho nu, nomeadamente cor, consistência (se são moldadas, rígidas ou diarreicas), e presença de áreas com muco e, ou sangue, as quais devem ser incluídas nas porções a analisar. O exame direto a fresco realiza-se através da preparação de um esfregaço numa lâmina a partir de uma pequena porção de fezes numa gota de soro fisiológico, e visualização ao microscópio.

Na observação microscópica com ampliação de 100x e 400x avalia-se a presença de leucócitos, eritrócitos, parasitas e fungos. A presença de eritrócitos e leucócitos nas fezes não é normal. A observação de leucócitos pode indicar a presença de infeções bacterianas, não estando presentes no caso de infeções virais ou parasitárias (43,48). Posteriormente, as lâminas do exame direto são fixadas e efetua-se a coloração de Gram para avaliação da flora predominante. Na flora normal podemos verificar uma maior quantidade de anaeróbios como *Bacteroides*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium*, e *Eubacterium* e em menor quantidade aeróbios como *E.coli*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Streptococcus* (43).

Na avaliação microscópica das fezes destaca-se a deteção de bacilos Gram negativo espiralados móveis sugestivos de *Campylobacter*, bacilos Gram negativos móveis sugestivos de *Samonella* spp e bacilos Gram negativos não móveis sugestivos de *Shigella* spp(41).

7.2.4 Exame bacteriológico

O exame bacteriológico auxilia na identificação de bactérias e fungos causadores de várias patologias, nomeadamente gastroenterite aguda. Assim, devem ser utilizados meios de cultura que permitam a identificação dos principais agentes patogénicos causadores de gastroenterite aguda como *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Campylobacter spp*. Os meios utilizados encontram-se apresentados na tabela VI (41,49).

Tabela VI: Características dos meios de cultura para amostra de fezes.(Humphries RM, Linscott AJ. Laboratory diagnosis of bacterial gastroenteritis. Clin Microbiol Rev. 2015;28(1):3–31.)

Meio de cultura	Constituição principal	Inibidores do meio	Principal deteção
Selenito	Peptonas de caseína, lactose, fosfato de sódio	Selenito de sódio	Meio enriquecimento seletivo para <i>Salmonella e Shigella</i>
Salmonela- <i>Shigella</i> agar (SS)	Peptonas, lactose, citrato férrico e tiosulfato de sódio, indicador vermelho neutro	Sais biliares e <i>brilliant green</i>	Meio diferencial seletivo para isolamento de bacilos entéricos patogénicos
<i>Campyloset</i>	Infusão coração, peptona de caseína, extrato de leveduras, sangue de cavalo lisado	Vancomicina, trimetoprim e polimixina B	Meio seletivo para isolamento de espécies de <i>Campylobacter</i>
<i>Saboroud</i>	Peptonas, elevada concentração de glucose	Cloranfenicol	Isolamento de espécies de <i>Candida spp</i>

O meio selenito é, um meio líquido de enriquecimento seletivo, indicado para a identificação de bacilos Gram negativos. Um dos constituintes, selenito de sódio, é responsável pela inibição da flora intestinal, nomeadamente, coliformes e estreptococos fecais, uma vez que é tóxico para a maioria das Enterobacterias (43,50). Após incubação de 18-24h a 35°C em meio selenito realizou-se repicagem para meio *Salmonella-Shigella* agar, um meio diferencial seletivo para o isolamento de bacilos Gram negativos entéricos patogénicos, possibilitando o isolamento de *Salmonella e Shigella*. No entanto, este meio pode inibir o crescimento de algumas espécies de *Shigella*(49). A diferenciação dos micro-organismos entéricos é efetuada através da fermentação da lactose e produção de H₂S.

A fermentação da lactose leva à produção de ácido que provoca alteração de cor do vermelho neutro. Colónias avermelhadas no caso de fermentadoras da lactose, ou

incolores no caso de não fermentadoras da lactose. A produção de H₂S é detetada através da presença de colónias de centro negro devido à presença de tiosulfato de sódio e citrato férrico (49,51). Os sais biliares e o *brilliant green* inibem microrganismos Gram positivo e enterobactérias, com exceção da *Salmonella spp* e *Shigella spp*.

A interpretação dos resultados do exame cultural neste meio consiste na avaliação da presença de colónias sugestivas de *Salmonella*, com cor bege e centro negro e de *Shigella*, que se apresenta incolor (51). Podem crescer também. colónias de *E.coli* com coloração rosa a avermelhada. O meio Campyloesel é um meio seletivo de isolamento de espécies de *Campylobacter* cujas principais características se encontram na tabela VII. A vancomicina inibe o crescimento de bactérias Gram positivo enquanto o trimetoprim e a polimixina B inibem a maioria dos Gram negativo. Após semear a amostra de fezes neste meio, a placa é incubada em condições de microaerofilia, através do recurso a invólucros produtores de gás descartáveis, e colocadas na estufa durante 48h (52). Neste meio as colónias de *Campylobacter* são pequenas e de coloração acinzentada. No laboratório Avelab as amostras de fezes diarreicas são semeadas no meio *Campyloesel*, selenito e por fim SS. Enquanto que as amostras de fezes moldadas são apenas semeadas em meio selenito e SS.

7.2.5 Exame micológico

Este exame realiza-se em meio de Sabouraud, um meio seletivo para o isolamento de fungos, que possui uma elevada concentração de glucose, não tolerada pela maioria das bactérias, favorecendo o crescimento de fungos. O cloranfenicol inibe o crescimento da maioria das bactérias *Gram* negativo e *Gram* positivo (53), permitindo avaliar a presença de fungos como espécies de *Candida*. Neste meio as colónias de *Candida* aparecem com coloração esbranquiçada. Para a sua identificação faz-se a repicagem para o meio *CandiSelect*, meio cromogénico que permite a identificação direta de *Candida Albicans* através da atividade enzimática. Neste meio as colónias de *C. albicans* apresentam coloração rosa a roxo(54).

7.2.6 Exame parasitológico

O exame parasitológico das fezes é efetuado através do exame direto e observação microscópica de um concentrado de fezes para pesquisa de parasitas fecais, onde são pesquisados parasitas fecais. Para tal, são requeridas três amostras de fezes, de preferência em dias alternados, devido à proliferação de bactérias não ser constante (42).

Para a obtenção de um concentrado de parasitas utiliza-se um sistema de ultrafiltração *Mini Parasep SF, Apacor, Wokingham, Inglaterra*, conforme apresentado na Figura 3(55).

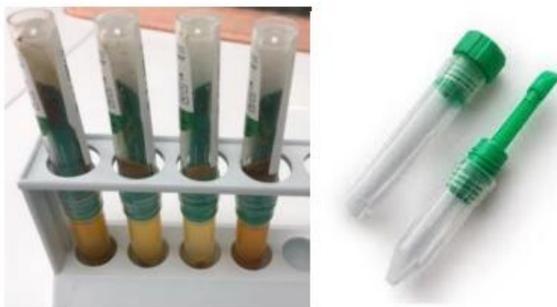


Figura 3: concentrador de parasitas fecais mini Parasep

No decorrer do estágio foram identificados na observação macroscópica estruturas esbranquiçadas e no exame direto das fezes foram visualizados ovos e verme adulto como *Enterobius vermicularis* conforme representado nas Figuras 4 e 5. Pertencia a uma criança de 10 anos, com sintomas de prurido anal.



Figura 4: observação microscópica do ser adulto do parasita *Enterobius vermicularis*

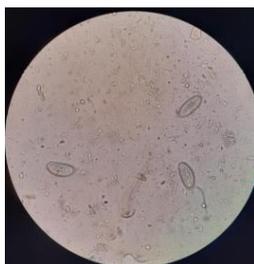


Figura 5: observação microscópica de ovos do parasita *Enterobius vermicularis*

7.3 Detecção de antígenos de *Helicobacter pylori*, adenovírus, rotavírus

Para a pesquisa de antígenos de *H. Pylori*, adenovírus e rotavírus são necessários testes de pesquisa de antígenos que têm como metodologia base a imunocromatografia qualitativa através da utilização de cassetes. Este processo inicia-se com uma remoção do tamanho de uma ervilha picada em três zonas diferentes. De seguida, ocorre a introdução deste porção de amostra no recipiente juntamente com os reagentes de extração de antígenos apropriados, homogeneização no vórtex, espera do tempo para ação do reagente e por fim adição da amostra à cassete.

Na membrana da cassete encontram-se bandas de reação revestidas de anticorpos monoclonais contra antígenos alvo dos microrganismos, acoplados a conjugados de microesferas coloridos. Assim, após adição da amostra esta migra por capilaridade ao longo da membrana. Caso a amostra apresente os antígenos correspondentes aos anticorpos membranares ocorre ligação antígeno-anticorpo, sendo o conjugado responsável pelo aparecimento da banda corada. Além desta, ocorre também o aparecimento da banda controlo, que demonstra a validação do teste, uma vez que assegura que existe volume suficiente de amostra, assim como a eficiência da migração e controlo interno de reagentes. Na deteção de adenovírus e rotavírus foi utilizada a mesma cassete com duas linhas teste, uma para cada vírus (56,57)

7.4 Exsudato vaginal

7.4.1 Exame direto e cultural

No exame direto do exsudato vaginal efetua-se a contagem de células epiteliais, eritrócitos e leucócitos, bem como a pesquisa de protozoários flagelados e de leveduras. Para isso é utilizada a coloração de Gram que permite avaliar a flora existente, sendo valorizada a presença de *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* (42). É também avaliada a presença de bacilos de Doderline. Se numa observação microscópica da coloração de Gram de uma amostra de exsudato vaginal estiverem presentes cocobacilos Gram variável aderentes às células epiteliais sugestivos de *Gardnerella* e se, se verificar a existência de bacilos Gram negativo, cocos Gram positivos em cadeia ou em cacho realiza-

se exame cultural em gelose de sangue. Quando ocorre observação de diplococos Gram negativos realiza-se exame cultural em gelose de chocolate PVX. Por fim, na identificação de fungos leveduriformes realiza-se o exame cultural em Sabouraud e posterior exame cultural em *CandiSelect* para identificação de *C.Albicans* (54).

7.4.2 Pesquisa de *Streptococcus agalactiae*

As amostras de exsudato vaginal-retal têm como objetivo o *screening* de *Streptococcus agalactiae* ou *Streptococcus* do grupo B em mulheres grávidas de 35-37 semanas, uma vez que esta bactéria pode ser transmitida através da passagem pela vagina durante o parto e conseqüentemente provocar infecções neonatais com conseqüências severas como pneumonia, septicemia e meningite(41).

As zaragatoas vaginais-retais são inoculadas em meio líquido enriquecido Todd Hewitt. Este meio possui na sua constituição peptonas e extrato de coração, que fornecem aminoácidos essenciais para o crescimento de *Streptococcus* beta hemolíticos, assim como dextrose que, estimula a produção de hemolisinas. O carbonato de sódio e fosfato dissódico neutralizam a acidez proveniente da fermentação da dextrose prevenindo a destruição das hemolisinas. Por este motivo, é utilizado para favorecer o crescimento de *Streptococcus* beta hemolíticos e produção de hemolisinas com o intuito do posterior isolamento destas bactérias após incubação de 24h a 37°C em meio seletivo como o meio cromogénico *Strep B*(58). Este último permite a identificação de colónias de *Streptococcus* do grupo B, pois possui substratos cromogénicos que são metabolizados por bactérias diferentes. Esta bactéria só metaboliza um dos substratos, apresentando colónias de coloração rosa. A leitura das placas do meio cromogénico *Strep B* deve ser efetuada após incubação de 24h, sendo o resultado dado como positivo ou negativo. No caso de negativo ocorre reincubação de 24h, de forma a diminuir risco de resultados falsos negativos(59).

7.5 Exsudatos purulentos

7.5.1 Exame direto e cultural

Os exsudatos purulentos provêm de feridas e úlceras de pressão, devendo a colheita ser realizada antes do início da antibioterapia. É feita uma avaliação macroscópica da cor e consistência do pus. Posteriormente, o exame direto consiste na observação microscópica do esfregaço efetuado a partir da zaragatoa após coloração de Gram, que permite a identificação de leucócitos e microrganismos. Quando é detetada a presença de muitas células epiteliais, a amostra pode ser considerada contaminada, ou seja, inadequada para posterior exame cultural (41). Contudo, deve ter-se em conta o local, tipo de colheita e histórico clínico. Assim, permite que o exame cultural seja realizado após identificação do micro-organismo e da sua valorização. (60,61). Os micro-organismos frequentemente associados a contaminação da pele são *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus*, e *difteróides*. Em contrapartida, devem sempre ser valorizados os seguintes micro-organismos, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* beta hemolítico do grupo A (61).

Os exsudatos purulentos semeiam-se nos seguintes meios, respeitando esta ordem, gelose de sangue, meio *CLED*, *MacConkey* e Manitol Salgado, ou seja, do meio menos seletivo para o mais seletivo, de forma a evitar contaminação dos meios. O meio gelose de sangue favorece o crescimento de bactérias fastidiosas devido à sua constituição em peptonas e extrato de leveduras, sendo que o conteúdo em sangue de ovelha fornece o fator X e permite a observação dos padrões de hemólise como alfa, beta e gama hemólise, relacionados com a presença de determinadas bactérias. A beta hemólise visualiza-se pela coloração amarelada das colónias, devido à completa lise dos eritrócitos e a alfa hemólise pela coloração esverdeada, com lise parcial dos eritrócitos, enquanto na gama hemólise é há ausência de hemólise (44,62). Este meio permite a deteção da beta hemólise, nomeadamente com o *Streptococcus pyogenes*, *S. agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, alfa hemólise em colónias de *Streptococcus pneumoniae* e outros estreptococos(62).

O meio *MacConkey* é utilizado para o isolamento de bacilos entéricos e diferenciação da fermentação da lactose. Este meio é constituído principalmente por peptonas e lactose, sendo que a presença de cristal violeta inibe o crescimento de

bactérias Gram positivo. Quando não ocorre fermentação da lactose as colónias são incolores na maioria ou rosa- avermelhadas, no caso de se tratar de *E.coli* (43).

O meio *CLED* ou agar de cisteína lactose deficiente em eletrólitos é um meio que permite a diferenciação da fermentação da lactose através do indicador azul de bromotimol. Desta forma, colónias fermentadoras da lactose apresentam coloração amarela, enquanto as não fermentadoras apresentam a coloração verde do meio. Contrariamente, a deficiência de eletrólitos inibe o crescimento de *Proteus spp.* e a presença de cisteína favorece o crescimento de coliformes. Assim, este meio favorece o crescimento de coliformes, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*(63).

O meio Manitol Salgado contém 7.5% de cloreto de sódio que inibe o crescimento da maioria das bactérias, favorecendo o isolamento seletivo de *Staphylococcus spp.* A fermentação do manitol ajuda na diferenciação de *Staphylococcus spp.*, sendo que os positivos para a coagulase produzem colónias amarelas com meio amarelo, enquanto as colónias coagulase negativa são vermelhas sem alteração de cor do indicador vermelho de fenol do meio.(43,64).

7.6 Exsudato orofaríngeo

Os exsudatos da orofaringe podem ser alvo de vários testes, nomeadamente a pesquisa de *Stafilococcus aureus* resistentes à meticilina, pesquisa de *S. aureus* e a pesquisa de *Streptococcus* do grupo A através da imunocromatografia em cassete.

7.6.1 Exame direto

No exame direto, através da coloração de Gram pode não ser possível a deteção de flora mista, uma vez que esta é constituída por uma grande densidade de bactérias aeróbias, anaeróbias facultativas e anaeróbias estritas, incluindo *Streptococcus* alfa hemolíticos e não hemolíticos, *Streptococcus* beta hemolíticos não pertencentes ao grupo A, *Neisserias* não patogénicas, *Haemophilus spp.*, *difteróides*, *Staphylococcus sp.*, *Micrococcus spp.*, anaeróbios (71).

7.6.2 Exame cultural

O exame cultural para pesquisa de *Streptococcus* beta hemolítico do grupo A realiza-se em gelose de sangue com incubação de 18-24 horas a 37°C numa atmosfera enriquecida com 5-10% de CO₂. Na visualização dos resultados, colônias beta hemolíticas suspeitas, com o teste de catalase negativo e suscetibilidade à bacitracina sugerem a presença de *Streptococcus* do grupo A. Contudo, este teste isolado não é adequado à identificação de *S. pyogenes*, uma vez que existem outros estreptococos suscetíveis à bacitracina. Assim, em conjunto deve ser realizado o teste pirrolidonil arilamidase, uma vez que o único *Streptococcus* beta hemolítico positivo para este teste é o *S. pyogenes*(72). Caso seja solicitado, pode efetuar-se a pesquisa por imunocromatografia em cassete (68).

Na pesquisa de *Staphylococcus* resistentes à meticilina a zaragatoa é semeada num quadrante com posterior arrastamento com ansa descartável de 1µl para os restantes 3 quadrantes em meio cromogénico *MRSA SMART*, seguido de incubação a 37°C durante 18-24 horas. Este meio permite uma melhor taxa de recuperação desta bactéria e leitura dos resultados após 18 horas, reduzindo o tempo de resposta. A interpretação dos resultados prende-se com a presença de colônias de cor vermelha que indicam um resultado positivo, enquanto colônias brancas representam um resultado negativo (73).

No exame cultural para pesquisa de *S. aureus* utiliza-se o meio manitol salgado, no caso de ser positivo, a cor do meio passa para amarelo.

7.7 Expetoração

A amostra de expetoração a analisar deve ser a primeira da manhã, uma vez que durante a noite ocorre a acumulação de secreções respiratórias. Contudo, para pesquisa de micobactérias é aconselhada a colheita de três amostras colhidas em dias consecutivos (43,71).

7.7.1 Exame direto

O diagnóstico de infecções do trato respiratório inferior é dificultado pela contaminação da amostra na colheita com o trato respiratório superior, devido à saliva e flora comensal da orofaringe (42,71).

O exame direto consiste na realização de esfregaço da porção purulenta da amostra e posterior coloração de Gram, permitindo a verificação da adequação da amostra e processamento das amostras com a qualidade adequada. Para tal, devem ser avaliados 10 campos com a objetiva de 10x. Nas amostras onde se verifique a presença de menos de 10 células epiteliais por campo e mais de 25 leucócitos por campo, é indicativo de monomorfismo bacteriano(71). Contudo, estes critérios não se aplicam a doentes neutropênicos, na pesquisa de micro-organismos específicos que não pertençam à flora normal da orofaringe nem a colonizam como *Mycobacterium sp*, *Legionella sp*, *Mycoplasma sp*(42).

7.7.2 Exame cultural

O exame cultural é realizado em gelose de sangue e gelose de chocolate, seguido de incubação a 35°C durante 24-48 horas com 5% de CO₂ e em meio Sabouraud com incubação de 48-72 horas em aerobiose (42). A gelose de chocolate contém eritrócitos lisados fornecendo nutrientes importantes para o crescimento de micro-organismos fastidiosos como *Neisseria gonorrhoeae*, e *Haemophilus spp*. Estes últimos, causam infecções do trato respiratório (43). Os micro-organismos isolados na expectoração que sejam valorizados, devem ser reisolados, identificados e realizados os testes de suscetibilidade a antimicrobianos (42).

Nesta amostra devem-se valorizar os microorganismos Gram positivos como *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, Gram negativo como *Haemophilus influenza*, *Moraxella catarrhalis*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonaceae*, *Acinetobacter species* e fungos como *Candida* e *Aspergillus species*.

Na pesquisa de *Mycobacterium spp*, a descontaminação e fluidação da amostra têm como objetivo a eliminação de resíduos e contaminantes (43). A suspensão obtida pode ser utilizada para o exame direto com coloração de *Kinyoung* e exame cultural em *Lowenstein-Jensen*.

No exame direto é realizada a coloração de *Kinyoun*, ou seja, uma modificação da coloração *Ziehl Neelsen* para pesquisa direta de bacilo de *Koch* (BK). Esta deve ser observada ao microscópio em 300 campos com ampliação de 100x.

Caso sejam identificados bacilos ácido-álcool resistentes realiza-se a sua semi quantificação em raros (1 a 2 /300 campos), alguns (1 a 9 /100 campos), frequentes(1 a 9 /10 campos), muitos (1 a 9 /campo)e numerosos(> 10/ campo). Esta coloração baseia-se na constituição da parede das micobactérias cujo elevado teor em ácidos micólicos as torna resistentes à descoloração com soluções álcool-ácidas. Assim, os bacilos ácido-álcool resistentes são corados pelo primeiro corante carbolíscina, que os cora de rosa, enquanto outras bactérias e células são coradas com o segundo corante azul de metileno (43).

A coloração inicia-se com a fixação das lâminas à chama, seguida de incubação de 5 minutos com o corante carbolíscina, lavagem com água corrente para eliminação do excesso, incubação de 2 minutos com solução álcool-ácida (etanol 95% e ácido clorídrico a 37%), nova lavagem, incubação de 2 minutos com o corante azul de metileno (em solução alcoólica), lavagem e secagem das lâminas na estufa.

Caso sejam identificados bacilos álcool-ácido resistentes, o exame cultural é efetuado em meio *Lowenstein-Jensen* a 37°C durante 6 semanas. Realiza-se a avaliação semanal das colónias, posterior coloração pelo método de *Kinyoun* a partir das mesmas e interpretação do resultado após 6 semanas como positivo ou negativo para *Mycobacterium spp.* No final, efetua-se o envio da amostra para laboratório exterior de referência para realização de teste de suscetibilidade a antimicrobianos.

7.8. Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

Os testes de suscetibilidade a antimicrobianos são feitos no autoanalisador Phoenix BD.

Neste último é realizada a identificação bioquímica de isolados bacterianos, bem como testes de suscetibilidade a antimicrobianos (TSA). Nos testes de suscetibilidade a antimicrobianos este equipamento quantifica a concentração mínima inibitória para cada fármaco, através da exposição da bactéria a diferentes concentrações de antibióticos obtidas através da micro diluição com volumes iguais ou inferiores a 0.1ml de antibióticos.

A concentração mínima inibitória corresponde à concentração mínima de um fármaco para o qual não é detectado crescimento bacteriano visível (71). Os testes de resistência a fármacos estão incluídos nos painéis nomeadamente, a confirmação de beta-lactamases de largo espectro para *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca*, detecção de beta lactamase em *Staphylococcus*, resistência a metilicina no *Staphylococcus aureus*, resistência à vancomicina em *Enterococcus* e *Staphylococcus aureus*, resistência de alto nível a aminoglicosídeos em *Enterococcus* (72).

A escolha do painel a inocular é realizada de acordo com o isolado bacteriano. Os painéis UNIMIC-809 são utilizados para *Enterobactereaceae*, os painéis NMIC ID 415 para *Pseudomonaceae* e outros bacilos Gram negativos não *Enterobactereaceae*, os painéis PMIC-ID88 para *Staphylococcus spp*, *Enterococcus spp* e *Streptococcus agalactiae*.

Nos isolados bacterianos da *E.coli* e *Proteus mirabilis* apenas se realiza o TSA. Os painéis contêm 136 micropoços e encontram-se divididos em duas colunas, a de identificação e a de suscetibilidade a antibióticos: Na coluna de identificação encontram-se 45 micropoços com reagentes adsorvidos que funcionam como substratos para as reações de identificação bacteriana e dois controlos de fluorescência; Na coluna de TSA encontram-se 85 micropoços com várias concentrações de antibióticos, controlos de crescimento bacteriano e controlos de fluorescência. Este equipamento utiliza um indicador colorimétrico redox para TSA e um conjunto de indicadores colorimétricos e fluorométricos para a identificação bacteriana (71). Nos painéis são colocados inóculos com características definidas.

Para a preparação dos inóculos, com a zaragatoa, retiram-se algumas colónias a partir de cultura bacteriana pura, suspendem-se as mesmas no tubo ID até obtenção de turvação entre 0,4 e 0,6 na escala de *Mc Farland*. Posteriormente, adiciona-se uma gota de indicador ao tubo TSA. Após homogeneização por inversão do tubo ID transferem-se 25µl deste para o tubo TSA. Por fim, realiza-se a inoculação dos painéis vertendo o tubo ID na coluna da direita e o tubo TSA para a coluna da esquerda. Os painéis são colocados no autoanalisador.

Quando os resultados obtidos são discordantes do histórico clínico do utente, testam-se outros antibióticos não presentes nos painéis, TSA, através do método de manual *Kirby Bauer*.

O método de *Kirby Bauer* inicia-se com a preparação do inóculo em 5 ml de soro fisiológico com turvação de 0,5 na escala de *Mac Farland* a partir da cultura pura.

De seguida, realiza-se a sementeira em três direções no meio *Muller Hinton*. Posteriormente, são colocados discos de papel impregnados com os antibióticos a testar. Após incubação, medem-se os diâmetros dos halos de inibição em redor dos discos e interpretam-se os resultados como suscetível ou resistente, utilizando as normas de EUCAST (73).

7.9 Técnicas Manuais

O teste **Indol** tem como função a identificação presuntiva de *Enterobacteriaceae* através da pesquisa da enzima triptofanase. Os resultados do mesmo prendem-se com um resultado positivo, apresenta cor azul; enquanto que um resultado negativo apresenta cor rosa.

O teste **TDA** testa a atividade de triptofano desaminase na identificação de *Enterobacteriaceae*. Os resultados positivos apresentam, cor castanha; resultados negativos não ocorre reação

O teste da **oxidase** permite a diferenciação entre as bactérias Gram negativas, através da presença do complexo enzimático denominado de citocromo oxidase C. Um resultado com cor azul indica oxidase positiva *Pseudomonas spp.*

O teste da **catalase** permite a identificação de bactérias Gram positiva. Na presença de um resultado positivo ocorre efervescência.

O teste da **coagulase** permite a diferenciação entre *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus saprophyticus*. Sendo o *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, com produção de coágulo e *Staphylococcus saprophyticus*, coagulase negativa sem produção de coágulo (76).

7.10 Caso Clínico

Ao laboratório AVELAB, deu entrada um exsudato purulento de uma úlcera de pressão proveniente de uma utente de sexo feminino, que se encontrava num lar. Após a triagem foi realizada uma avaliação macroscópica da cor e consistência do pus., que se apresentava com aspeto esbranquiçado e o pus apresentava alguma consistência.

De seguida, foi realizada uma coloração de Gram, onde foram identificados leucócitos e bacilos Gram negativo e positivo.

Posteriormente a amostra foi inoculada nos meios de gelose de sangue, *CLED*, *MacConkey*, Manitol Salgado e foram incubadas a 35°C durante 18h-24h.

Após 24h verificou-se um crescimento de colónias cinzentas esverdeadas, com aspeto mucóide na gelose de sangue:

No meio *CLED* verificamos colónias esverdeadas no meio azul.

No meio de Manitol Salgado não ocorreu crescimento.

Com estas características, podemos suspeitar de *Pseudomonas aeruginosa*, que indicam que a bactéria não fermenta a lactose e verificamos que contém o cheiro característico. De seguida realizou-se o teste da oxidase, cujo resultado foi positivo. Contudo, dado que não se tratava de uma cultura pura repicou-se para o meio Meio citrimida, pois inibe o crescimento de outras bactérias da flora microbiana através da libertação de nitrogénio e fósforo das suas paredes celulares. Neste meio obtiveram-se colónias esverdeadas que foram isoladas para o meio CPS para posterior realização de antibiograma no equipamento automático, cujo resultado confirmou a suspeita.

8.IMUNOLOGIA

No laboratório AVELAB, a amostra biológica mais utilizada para na realização dos testes imunológicos é o soro são utilizados dois autoanalisadores para a obtenção dos resultados dos parâmetros a analisar, nomeadamente Phadia 250 que se destina a análises de alergias e autoimunidade através da tecnologia ImmunoCAP (Anexo) e no Architect ci8200 são realizados diversas análises, maioritariamente para detetar a reação antigénio- anticorpo, mais comuns, nomeadamente pesquisa de anticorpos Anti HIV 1 e 2, anticorpos e antigénios para as diversas hepatites, pesquisa de rubéola, citomegalovírus, toxoplasmose, entre outros.

Os controlos para obtenção dos resultados destes parâmetros são realizados diariamente. Para tal, são utilizados três níveis de controlo, sendo o nível 1 o nível não patológico, o nível 2 o intermediário e o nível 3 o patológico. Estes níveis são controlados alternadamente nos vários dias de trabalho.

As calibrações são realizadas apenas quando os autoanalisadores detetam que são necessárias ou quando existe mudança de lotes de reagentes.

9.BIOQUÍMICA

O setor da Bioquímica permite avaliar parâmetros metabólicos para uma melhor orientação e monitorização da terapêutica administrada ao utente. As principais amostras biológicas utilizadas são o soro e a urina, sendo o soro a amostra mais prevalente.

A urina é utilizada para a avaliação de múltiplos parâmetros bioquímicos, nomeadamente a avaliação da microalbuminúria, que é necessária uma colheita da urina de 24 horas

Diariamente e antes de se iniciar a realização das análises é necessário proceder ao controlo dos autoanalisadores. e calibração quando necessário

Os controlos efetuados diariamente para todas as análises bioquímicas realizadas através de 3 reagentes diferentes, nomeadamente o nível baixo; intermédio e alto. Por fim os valores obtidos são convertidos em valores comparáveis com o método de Westergreen (método de referência) mas com maior sensibilidade e especificidade e o uso de menos amostra. Os autoanalisadores utilizados podem ser consultados no anexo

10.CONCLUSÃO

Este estágio curricular deu-me a oportunidade de melhorar os meus conhecimentos, assim como a sua aplicação, para um melhor futuro profissional. Assim, posso retirar como conclusão a importância e necessidade absoluta de executar todas as tarefas laboratoriais, em todas as fases do processo analítico, com o maior rigor e perfeição possível. Apenas deste modo é possível oferecer a qualidade de diagnóstico pretendida.

Através das várias técnicas realizadas que aprendi e aperfeiçoei, melhorei a minha responsabilidade para as boas práticas de diagnóstico laboratorial de modo que possíveis erros sejam minimizados e uma boa orientação terapêutica seja providenciada ao utente. Também me deparei com a elevada importância da consolidação dos conhecimentos teóricos entre todas as valências das Análises Clínicas, para que uma boa validação dos resultados seja efetuada. Por último, este estágio também me permitiu melhorar o espírito crítico e autonomia na resolução de problemas que possam surgir na rotina do laboratório, assim como gerir adequadamente os recursos disponíveis como recursos de tempo e económicos. Em suma, posso concluir que adquiri excelentes conhecimentos para ser uma boa profissional na área da saúde.

11.ANEXO

Setor	Aparelho	Função
Hematologia	Sysmex XT-2000i	Hemograma
	ADAMS A1c HÁ-8180v	Controlo de Hemoglobina A1c
	ADAMS A1c HÁ-8180t	Controlo de Hemoglobina A1c
	StaRRSed Auto-Compact	Velocidade de sedimentação
	Sysmex XE2100	HemoGramma
	StaRRSed	Velocidade de sedimentação
	STA Compact Max	Testes de Coagulação
Bioquímica	Capillarys Sebia 2	Eletroforese de proteínas
	Architec ci8200	Deteção e quantificação de parâmetros Bioquímicos
	Architect i1000	Deteção e quantificação de Fármacos
Microbiologia	Aution Max AX-4030	Sumária de Urina
	Phoenix 100 BD	Identificação de Bactérias e TSA
	Sedimax	Microscopia eletrónica
	Sentifit 270	Imuniturbidimetria
Imunologia	Phadia 250	Testes de Alergias e Autoimunidade
	Architect ci8200	Deteção e quantificação de Ag e Ac

12.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.Emile JF, Abba O, Frairot S, et al: Revised classification of histiocytoses and neoplasms of the macrophage-dendritic cell lineages. *Blood* 127(22):2672–2681, 2016. doi: 10.1182/blood-2016-01-690636;
- 2.Höck, M., Zelger, B., Schweigmann, G. et al: The various clinical spectra of juvenile xanthogranuloma: Imaging for two case reports and review of the literature. *BMC Pediatr* 19, 128 ,2019. doi: 10.1186/s12887-019-1490-y.
3. Hematologia laboratorial em urgência [Acedido a 2/3/2022]. Disponível na internet:<https://www.estesl.ipl.pt/cursos/mestrados/tecnologias-clinico-laboratoriais/hematologia-laboratorial-em-urgencia>
4. CELKAN, Tülin Tiraje - What does a hemogram say to us? Turk Pediatri Arsivi, Edição. Local: editor, data. ISBN.
5. Hanes H. – Glycohemoglobin in Whole Blood (2013-2014) [Acedido a 10/4/2022]. Disponível na internet: https://www.cdc.gov/nchs/data/nhanes/nhanes_13_14/GHB_H_MET_GLYCOHEMOGLOBIN.pdf
6. Analisador hematológico Sysmex XE-2100TM [Acedido a 20/3/2022]. Disponível na internet: <https://www.sysmex.com/LA/pt/Products/Hematology/XESeries/Pages/XE-2100- Hematology-Analyzer.aspx>
7. HENRY, J. B. - Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 20th Ed. Barueri: Manole, 2008. ISBN: 9788520430958
8. LEWIS, S. M.; BAIN, B. J.; BATES, I. - Hematologia prática de Dacie y Lewis. 9th Ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. ISBN: 9788491133193
9. MATOS, Januário F., et al. - O hemogram a nas anemias microcíticas e hipocrômicas: aspectos diferenciais. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v. 48, nº 4 (2012), p. 255-258.
10. Analisador hematológico Sysmex XE-2100TM [Acedido a 30/3/2022]. Disponível na internet: <https://www.sysmex.com/LA/pt/Products/Hematology/XESeries/Pages/XE-2100- Hematology-Analyzer.aspx> =6

11. KHOSA, Shafi Mohammad et al. - Comparative analysis of cellulose acetate hemoglobin electrophoresis and high-performance liquid chromatography for quantitative determination of hemoglobin A2. *Blood Res.* 2015 Mar; 50(1): 46-50
12. BADIOU, S., et al. - Comparison of Arkray/ELITech ADAMS HA8180V® with Bio-Rad Variant, TMII Turbo2.0® and Tosoh Bioscience HLC®-723G8 for HbA1c Determination. *J Clin Lab Anal.* (2014) Nov; 28(6); p. 428-434
13. URRECHAGA, Eloísa - Analytical evaluation of the ADAMSTTM A1c HA8180T analyzer for the measurement of HbA1c. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* (2018), 32: e22155
14. Hanes H. – Glycohemoglobin in Whole Blood (2013-2014) [Acedido a 10/4/2022]. Disponível na internet: https://www.cdc.gov/nchs/data/nhanes/nhanes_13_14/GHB_H_MET_GLYCOHEMOGLOBIN.pdf
15. MONDAL H., BUDH DP. – Hematócrito. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, Jan. 2021. [Acedido a 9 de maio de 2021]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542276/>
16. KEOHANE, Elaine M.; SMITH, Larry J.; WALENGA, Jeanine M. - Rodak's Hematology clinical principles and applications, 5th Ed. Missouri: Elsevier Saunders, 2016. ISBN: 978-0-323-23906-6
17. FORD, J. – Red blood cell morphology. *International Journal of Laboratory Hematology*, 35 (2013), p. 351-357.
18. GUPTA, V.; TISHKPWSKI, K. - Erythrocyte Sedimentation Rate. [Updated 2022 May 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan. [Acedido a 10/4/2022]. Disponível na internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557485/>
19. BAIN, Barbara; BATES, Imelda; LAFFAN, Mike; LEWIS, S. – Dacie and Lewis Practical Haematology. 11th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2011. ISBN 13: 9780702034084
20. Hanes H. – Glycohemoglobin in Whole Blood (2013-2014) [Acedido a 10/4/2022]. Disponível na internet: https://www.cdc.gov/nchs/data/nhanes/nhanes_13_14/GHB_H_MET_GLYCOHEMOGLOBIN.pdf

21. HOFFBRAND, A. Vitor; MOSS, Paul A.H. – Hoffbrand's Essential Hematology, 6th Ed., Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, 2015. ISBN: 9781118408674
22. AARON, Joshua - Incentive-based compensation for CEOs in small and medium sized enterprises: Does pay for performance matter? Journal of Business & Entrepreneurship (2013), 25(1), 1–19.
23. RODAK, Bernadette F.; CARR Jacqueline H. - Clinical Hematology Atlas, 5th Ed., Elsevier-Health Sciences Division, 2016. ISBN: 9781455708307.
24. SLS detection method. [Acedido a 20/5/2022]. Disponível na internet: <https://www.sysmexeurope.com/n/academy/knowledge-centre/technologies/sls-detectionmethod>
25. BIAN B.J. - Diagnosis from the Blood Smear. N Engl J Med. 2005; 353(5): p.498–507
26. RUHI R. - Leishman staining-principle, preparation, procedure (2018) [Acedido em 20/5/2022]. Disponível na internet: <https://paramedicsworld.com/hematology-practicals/leishman-staining-principle-procedure-interpretation/medical-paramedical-studynotes>
27. TURGEON, Mary L. – Clinical Hematology: Theory and Procedures. 5th Ed., Philadelphia, Wolters, 2012. ISBN: 9781496332288
28. Devkota, S. -The gut microbiome during acute lifestyle transition. Nat Med 26 (2020), 1013–1015
29. AVELAB- Laboratórios Medicos de Análises Clínicas [Acedido em 23/06/2022]. Disponível na internet: <https://avelab.pt/avelab>
30. ABRAMSON, Neil – Rouleaux formation. Blood, 2006; 107 (11): 4205
31. COSTA BMB, et al. Interference of cold agglutinin autoantibodies in erythrogram interpretation: A case report and literature review. J Bras Patol e Med Lab. 2018;54(4):249–52.
32. BAIN, Barbara; BATES, Imelda; LAFFAN, Mike; LEWIS, S. – Dacie and Lewis Practical Haematology. 11th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2011. ISBN 13: 9780702034084

33. SILVA, Grazielle; et al. – Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 2006, 42 (2), p.77-78
34. KHOSA, Shafi Mohammad et al. - Comparative analysis of cellulose acetate hemoglobin electrophoresis and high-performance liquid chromatography for quantitative determination of hemoglobin A2. *Blood Res.* 2015 Mar; 50(1): 46-50
35. BAIN, Barbara – *Blood Cells: A Practical Guide*. 4th Ed.: Blackwell, 2006. ISBN: 13-978-1-4051-4265-6
36. Teste indireto da antiglobulina (coombs indireto) [Acedido a 3/05/2022]. Disponível na internet: [Buscar resultados para: teste de coombs indireto - Manuais MSD edição para profissionais \(msdmanuals.com\)](#)
37. Teste direto da antiglobulina (combs direto) [Acedido a 3/05/2022]. Disponível na internet: <https://www.msdmanuals.com/pt-pt/profissional/multimedia/table/teste-direto-da-antiglobulina-coombs-direto>
38. HOFFBRAND, A.Vitor; MOSS, Paul A.H. – *Hoffbrand's Essential Hematology*, 6th Ed., Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, 2015. ISBN: 9781118408674
39. Longo V.D.; Fontana L. - Calorie restriction and cancer prevention: metabolic and molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci.* 2010 Feb; 31(2): 89-98.
40. FDA, STA Compact Max. [Acedido a 5/5/2022]. Disponível na internet: www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf13/K130090.pdf
41. Isenberg HD, Garcia L. - *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 13th Ed., ASM PRESS, 2010. ISBN: 9781555815271
42. Fonseca A., Sebastião C., Cardoso F. - Programa Nacional de Controlo de Infecção - Orientações Para a elaboração de um Manual de boas práticas em Bacteriologia. Ministério da Saúde Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. 2004.
43. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. - *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 12th Ed., Elsevier; 2007. ISBN: 13-9780323016780
44. Yarbrough M.L., et al. - Culture of urine specimens by use of chromID CPS elite medium can expedite *Escherichia coli* identification and reduce hands-on time in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2016; 54(11): 2767–2773.

45. CHROMID® CPS® Elite and other CHROMID® media for urinary tract infections [Acedido a 7/7/2022]. Disponível na internet: <https://www.biomerieux-diagnostics.com/chromidrcpsr-elite-and-other-chromidr-media-urinary-tract-infections>
46. TDA reagent [Acedido a 7/7/2022]. Disponível na internet: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/80353?lang=pt®ion=PT>
47. TDA Reagent [Acedido a 7/7/2022]. Disponível na internet: <https://ridacom.com/en/products/view/3827>
48. Kasirga E. - The importance of stool tests in diagnosis and follow-up of gastrointestinal disorders in children. Turk Pediatr Ars. 2019;54(3):141-8.
49. Humphries RM, Linscott AJ. - Laboratory diagnosis of bacterial gastroenteritis. Clin Microbiol Rev. 2015;28(1):3-31.
50. BBL™ Selenite-F Broth [Acedido a 12/7/2022]. Disponível na internet: [https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/L007497\(09\)\(0207\).pdf](https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/L007497(09)(0207).pdf)
51. Becton Dickinson. Agar Salmonella Shigella [Acedido a 12/7/2022]. Disponível na internet: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9082>
52. Company BD and. BD Campylobacter Agar. Instruções úteis em placas prontas a usar [Internet]. 2003;(junho):1-4. Disponível na internet: <https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/PT-PA254464.pdf>
53. BD Sabouraud Agar with Chloramphenicol [Internet]. Available from: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9079>
54. CandiSelect [Internet]. Available from: https://www.biorad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/en/63746_26205A_US.pdf
55. APACOR. Mini Parasep for Faecal Concentration of Helminth Ova and Larvae / Protozoa Cysts and Oocysts [Internet]. 2018. p. 1-2. Available from: <https://www.apacor.com/wp-content/uploads/2019/01/APA158-Mini-Parasepv4.1-1.pdf>
56. Calik Z, et al. - Investigation of Helicobacter pylori antigen in stool samples of patients with upper gastrointestinal complaints. Brazilian J Microbiol [Internet]. 2016;47(1):167-71

57. Cromatest. ROTA-ADENOVIRUS combo cassette. Linear Chem [Internet]. :693– 4. Available from: http://www.linear.es/ficheros/archivos/838_4200220Rotaadenoviruscassette20ting.pdf
58. Todd Hewitt Broth [Internet]. Available from: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/IFU64800.pdf>
59. Morita T., et al. - Evaluation of chromID strepto B as a screening media for Streptococcus agalactiae. BMC Infect Dis. 2014;14(1):2–5.
60. Bowler, PG; Duerden BI; Armstrong, DG. - Wound microbiology and associated approaches to wound management. Clin Microbiol Rev. 2001;14(2):244–69.
61. BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood [Internet]. Available from: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9063>
62. BLOOD AGAR PLATES (BAP)- University of Wyoming [Internet]. Available from: http://www.uwyo.edu/molb2021/additional_info/summ_biochem/bap.html
63. BD CLED Agar [Internet]. Available from: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9062>
64. BD Mannitol Salt Agar [Internet]. Available from: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9074>
65. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Medical Microbiology. 9th Ed., Elsevier, 2021. ISBN: 9780323673228
66. Aryal S. Cetrinide Agar- Composition, Principle, Uses, Preparation and Colony Morphology [Internet]. 2018. Available from: <https://microbiologyinfo.com/cetrinide-agar-composition-principle-usespreparation-and-colony-morphology/>
67. Em UM, A PP. BD Mannitol Salt Agar [Internet]. 2013. p. 7–9. Available from: <https://www.bd.com/resource.aspx?id=9074>
68. Levy C. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. Vol. unico, Manual de Microbiologia Comemorativa do IX congresso Brasileiro de Controle de Infecção Hospitalar. 2004 [Acedido a 6/8/2022]. Disponível na internet: https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_microbiologia_completo.pdf

69. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. - Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 12th Edition, Mosby Elsevier, China, 842-855
70. CHROMID® MRSA SMART [Internet]. Available from: <https://www.biomerieux.es/diagnostico-clinico/productos/chromid-mrsa-smart>
71. Pasarell L. Laboratory procedure manuals-BD Phoenix™ PMIC/ID Panels. :1-9. Available from: https://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/clsi/clsiPhoenix_gram_Positive_V5.15_V4.31.pdf
72. BD Phoenix™ Automated Microbiology System [Internet]. Available from: <file:///C:/Users/henri/Downloads/BD Phoenix 100 Overview.pdf>
73. Matuschek E, Brown DFJ, Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2014;20(4):0255-66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12373>
74. UK NEQAS Microbiology [Internet]. Available from: <https://ukneqasmicro.org.uk/participant-info/>
75. Koneman, E.; Allen, S.; Janda W.; Schreckenberger, P.; Winn, W. - Diagnóstico microbiológico. 5ª ed., Editorial Panamericana SA Argentina, 2004. ISBN:
76. Joseph B Lopez. A. Burtis, Edward R. Ashwood and David E. Bruns, (2012). 5ed. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis(28),104-105