



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Daniela Filipa Fernandes Veiga

Relatório de Estágio
Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Doutor Pedro Nuno Sousa Alves Lisboa de Paiva e pela Professora Doutora Olga Maria Antunes Rodrigues Carvalho Cardoso e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2019



1 2 9 0

UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Daniela Filipa Fernandes Veiga

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de estágio curricular, realizado no Laboratório de Análises Clínicas São Lázaro, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Doutor Pedro Nuno Sousa Alves Lisboa de Paiva e pela Professora Doutora Olga Maria Antunes Rodrigues Carvalho Cardoso e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2019

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”*

Ricardo Reis
(Heterónimo de Fernando Pessoa)

Agradecimentos

O final desta etapa do meu percurso académico foi possível graças a todos aqueles que sempre acreditaram em mim, me apoiaram e comigo trabalharam.

Ao Doutor Duarte Paiva agradeço por tornar possível a realização deste estágio no Laboratório de Análises Clínicas São Lázaro.

Ao meu orientador Doutor Pedro Paiva, um obrigada não é capaz de traduzir toda a gratidão que sinto pela orientação incansável, colaboração, pelos conhecimentos partilhados e por toda a ajuda ao longo da minha passagem pelo LACSL.

Ao Doutor Jaime Peliteiro, à Doutora Alda Ferreira e à Doutora Cristina Silva, um enorme obrigada pelos conhecimentos e experiência transmitidos.

Um agradecimento especial à Técnica Sílvia Carvalho por todo o apoio e colaboração.

A toda a equipa do laboratório, um obrigada por toda a cooperação.

À minha orientadora Professora Doutora Olga Cardoso agradeço pela atenção e por estar sempre disponível para me apoiar.

À minha família e amigos agradeço todo o amor, incentivo e pelo apoio incondicional.

Mariana, Vera, Catarina, Joana, Pedro e João... Convosco a meu lado, Coimbra teve mais encanto.

A todos um obrigada de coração,

Daniela Veiga

Índice

Lista de abreviaturas	xi
Lista de símbolos	xiv
Índice de figuras	xv
Índice de tabelas	xvi
Resumo	xvii
Abstract	xix
1. Introdução	21
2. Caracterização do Laboratório de Estágio	22
3. Atividades desenvolvidas	23
3.1. Fase pré-analítica	23
3.1.1. Colheitas	24
3.1.2. Controlo de Qualidade	24
a. Controlo de Qualidade Interno (CQI)	25
b. Controlo de Qualidade Externo (CQE).....	25
3.2. Fase analítica	26
3.2.1. Hematologia	28
a. Colheita.....	29
b. Hemograma com contagem de plaquetas	30
b.1. Eritrócitos	31
b.2. Hemoglobina.....	32
b.3. Leucócitos	32
b.4. Plaquetas.....	33
c. Esfregaço de sangue periférico	35
d. Alterações dos elementos figurados	35
d.1. Alterações nos eritrócitos	35
d.2. Alterações nos leucócitos	38
d.3. Alterações nas plaquetas	39
e. Hemoglobina glicada.....	41
e.1. Significado clínico da HbA1c	41
f. Velocidade de Sedimentação dos Eritrócitos	42
f.1. Significado clínico da VES.....	42
g. Coagulação do sangue.....	43
g.1. Coagulação <i>in vivo</i>	43
g.2. Tempo de Protrombina e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada	44

g.3. Alongamento do TP e/ou TTPA e o seu significado clínico	45
g.4. Tratamento com o anticoagulante warfarina.....	45
h. Grupos sanguíneos	46
h.1. Sistema AB0.....	46
h.2. Sistema Rh.....	47
h.3. Determinação dos grupos sanguíneos.....	47
h.4. Importância dos sistemas AB0 e Rh.....	48
i. CQI na secção de Hematologia.....	48
j. Caso clínico.....	49
3.2.2. Microbiologia	51
a. Exame direto a fresco e após coloração	51
a.1. Coloração de Gram	52
a.2. Coloração de Kinyoun	53
b. Exame cultural	53
c. Condições de incubação no LACSL	54
d. Colheita e processamento das amostras biológicas	54
d.1. Urina	54
d.1.1. Colheita.....	55
d.1.2. Processamento	55
d.1.2.1. Análise sumária de urina	55
d.1.2.2. Urocultura.....	56
d.2. Fezes.....	57
d.2.1. Colheita.....	58
d.2.2. Processamento	58
d.2.2.1. Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp. e <i>Shigella</i> sp. (Coprocultura).....	58
d.2.2.2. Pesquisa de <i>Campylobacter</i> spp.....	60
d.2.2.3. Pesquisa de <i>Helicobacter pylori</i>	60
d.2.2.4. Pesquisa de Rota e Adenovírus	61
d.2.2.5. Exame parasitológico	62
d.3. Expetoração.....	62
d.3.1. Colheita.....	63
d.3.2. Processamento	63
d.3.2.1. Avaliação da qualidade de amostras de expetoração	63
d.3.2.2. Pesquisa de Bacilos Ácido-Álcool Resistentes (BAAR).....	65
d.3.2.2.1. Fluidificação e descontaminação de expetoração para pesquisa de BAAR... 65	
d.4. Exsudados faríngeos, nasais e auriculares	67

d.4.1. Colheita	67
d.4.2. Processamento	67
d.4.2.1. Pesquisa de <i>Streptococcus</i> β -hemolíticos do grupo A (<i>Streptococcus pyogenes</i>)	67
d.5. Exsudados vaginais/endocervicais e uretrais	68
d.5.1. Colheita	69
d.5.2. Processamento	70
d.5.2.1. Exame direto a fresco e após coloração de Gram.....	70
d.5.2.2. Pesquisa de <i>Streptococcus</i> β -hemolíticos do grupo B (<i>Streptococcus agalactiae</i>)	71
d.5.2.3. Pesquisa de <i>Mycoplasma</i> sp. e <i>Ureaplasma</i> spp.	72
d.5.2.4. Pesquisa de <i>Chlamydia trachomatis</i>	72
d.6. Supurações.....	73
d.6.1. Colheita	73
d.6.2. Processamento	73
d.7. Outros produtos	74
e. Identificação e antibiograma	74
e.1. Testes de diferenciação e orientação	74
e.1.1. Teste da catalase	74
e.1.2. Teste da oxidase.....	75
e.1.3. Teste ureia-indol	75
e.1.4. Slidex Staph.....	76
e.1.5. Prova da filamentação.....	76
e.2. Analisador automatizado Vitek 2-compact.....	76
f. CQI na secção de Microbiologia	77
g. Caso clínico	79
3.3. Fase pós-analítica	80
4. Conclusão.....	81
5. Bibliografia	83
6. Anexos.....	91
6.1. Anexo I - Bioquímica, Imunologia e Endocrinologia.....	91
6.2. Anexo II - Serologia.....	92
6.3. Anexo III - Esfregaço sanguíneo (Critérios).....	93
6.4. Anexo IV - Coloração de esfregaço de sangue periférico.....	95
6.5. Anexo V - Coloração de Gram	97
6.6. Anexo VI - Coloração de Bacilos Ácido-Álcool Resistentes (KINYOUN)	98

Lista de abreviaturas

- **ANA's** - Anticorpos antinucleares;
- **Anti-HA** - Anticorpos contra o vírus da hepatite A;
- **Anti-HBs** - Anticorpos contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B;
- **Anti-La** - Anticorpos contra o antígeno La;
- **Anti-Ro** - Anticorpos contra o antígeno Ro;
- **Anti-Tg** - Auto-anticorpos da tiroglobulina;
- **Anti-TPO** - Auto-anticorpos contra a peroxidase da tiróide;
- **APTT** - Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada;
- **ATCC** - American Type Culture Collection;
- **BAAR** - Bacilos Ácido-Álcool Resistentes;
- **CA 125** - Glicoproteína semelhante à mucina;
- **CA 19.9** - Antígeno do cancro do cólon;
- **CaCl₂** - Cloreto de cálcio;
- **CEA** - Antígeno carcinoembrionário;
- **CHCM** - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média;
- **CLED** - Cistina Lactose Deficiente em Eletrólitos;
- **CMI** - Concentração Mínima Inibitória;
- **CMV G** - Anticorpos de imunoglobulina G contra citomegalovírus;
- **CMV M** - Anticorpos de imunoglobulina M contra citomegalovírus;
- **CO₂** - Dióxido de carbono;
- **COS** - Gelose Columbia enriquecida com 5% de sangue de carneiro;
- **CQE** - Controlo da Qualidade Externo;
- **CQI** - Controlo da Qualidade Interno;
- **DGS** - Direção-Geral da Saúde;
- **DHEA** - Sulfato de dehidroepiandrosterona;
- **DNA** - Ácido desoxirribonucleico;
- **EDTA** - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético;
- **EUCAST** - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing;
- **Fe²⁺** - Ferro no estado ferroso;
- **Fe³⁺** - Ferro no estado oxidado;
- **FSH** - Hormona folículo-estimulante;

- **GDPN** - Laboratório de Genética Médica e Diagnóstico Pré-Natal Professor Doutor Sérgio Castedo;
- **H₂O** - Água;
- **H₂O₂** - Peróxido de hidrogénio;
- **H₂S** - Sulfureto de hidrogénio;
- **Hb A** - Hemoglobina A;
- **Hb A2** - Hemoglobina A2;
- **Hb F** - Hemoglobina fetal;
- **HbA1c** - Hemoglobina glicada;
- **HBc** - Anticorpos contra o antígeno central do vírus da hepatite B;
- **HBsAg** - Antígeno de superfície do vírus da hepatite B;
- **HCM** - Hemoglobina Corpuscular Média;
- **HCV** - Anticorpos de imunoglobulina G contra o vírus da hepatite C;
- **HDL** - Lipoproteína de alta densidade;
- **HIV** - Vírus da Imunodeficiência Humana;
- **HIV Ag/Ab** - Antígeno p24 do HIV e anticorpos contra o tipo 1 e/ou tipo 2 do HIV;
- **HPLC** - Cromatografia líquida de alta precisão;
- **IDP/PDW** - Índice de Dispersão das Plaquetas;
- **IgE** - Anticorpos de imunoglobulina E;
- **IgG** - Anticorpos de imunoglobulina G;
- **INR** - Razão Internacional Normalizada;
- **INSA** - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge;
- **ISI** - Índice de Sensibilidade Internacional;
- **KOH** - Hidróxido de potássio;
- **LACSL** - Laboratório de Análises Clínicas São Lázaro;
- **LCR** - Líquido cefalorraquidiano;
- **LDL** - Lipoproteína de baixa densidade;
- **LH** - Hormona luteinizante;
- **NaCl** - Cloreto de sódio;
- **NAD** - Dinucleótido de nicotinamida adenina;
- **NK** - Células *Natural Killer*;
- **O₂** - Oxigénio;

- **OMS** - Organização Mundial da Saúde;
- **PCR** - Reação em Cadeia da Polimerase;
- **PSA** - Antígeno específico da próstata;
- **RDW** - Índice de Distribuição dos Eritrócitos - Red Cell Distribution Width;
- **RIQAS** - Randox International Quality Assessment Scheme;
- **RNA** - Ácido ribonucleico;
- **Rub G** - Anticorpos de imunoglobulina G contra o vírus da rubéola;
- **Rub M** - Anticorpos de imunoglobulina M contra o vírus da rubéola;
- **SEQC** - Sociedade Espanhola de Química Clínica;
- **SLS** - Laurilsulfato de sódio;
- **SS** - Gelose *Salmonella Shigella*;
- **T3** - Triiodotironina;
- **T4** - Tiroxina;
- **TF** - Fator tecidual;
- **Toxo G** - Anticorpos de imunoglobulina G contra *Toxoplasma gondii*;
- **Toxo M** - Anticorpos de imunoglobulina M contra *Toxoplasma gondii*;
- **TP** - Tempo de Protrombina;
- **TPHA** - Treponema Pallidum Particle Agglutination Assay;
- **TPPA** - Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada;
- **TSH** - Hormona estimulante da tiroide;
- **UFC** - Unidades Formadoras de Colónias;
- **UKNEQAS** - United Kingdom National External Quality Assessment Schemes;
- **VCM** - Volume Corpuscular Médio;
- **VDRL** - Venereal Disease Research Laboratory;
- **VES** - Velocidade de Sedimentação dos Eritrócitos;
- **VMP** - Volume Plaquetário Médio;
- **VWF** - Fator *von Willebrand*;
- **β-hCG** - Gonadotrofina coriônica humana.

Lista de símbolos

- % - por cento/percentagem;
- ' - minutos;
- " - segundos;
- < - diminuição;
- > - aumento;
- **μL** – microlitro;
- **μm** - micrómetro;
- **dL** - decilitro;
- **fL** - fentolitro;
- **g** - grama;
- **h** - hora;
- **L** - litro;
- **mg** - miligrama;
- **mL** - mililitro;
- **mm** - milímetro;
- **mmol** - milimole;
- **mol** - mole;
- **nm** - nanómetro;
- **°C** - grau Celsius;
- **pg** - picograma;
- **r.p.m.** - rotações por minuto;
- **λ** - comprimento de onda.

Índice de figuras

Figura 1 - O processo de hematopoiese	29
Figura 2 - Esfregaço de sangue periférico com algumas das anomalias eritrocitárias que podem ser observadas em diferentes anemias.....	37
Figura 3 - Sombras Nucleares de Grumpect.....	40
Figura 4 - Cascata de coagulação do sangue.....	44
Figura 5 - Carta de identificação DiaClon AB0/Rh.....	48
Figura 6 - Esfregaço de sangue periférico	50
Figura 7 - Colónias de <i>Escherichia coli</i> (A) e de bactérias do género <i>Klebsiella</i> (B), isoladas em gelose CLED	57
Figura 8 - Amostras de exsudado vaginal/perianal inoculadas em gelose Granada para pesquisa de estreptococos β -hemolíticos do grupo B.....	71
Figura 9 - Colónias sugestivas de <i>Staphylococcus aureus</i> em gelose de Chapman.....	79
Figura 10 - Técnica para a realização de um esfregaço de sangue periférico.....	95

Índice de tabelas

Tabela 1 - Tubos utilizados na colheita de sangue total e plasma, no LACSL	30
Tabela 2 - Características e funções dos leucócitos granulares e agranulares	34
Tabela 3 - Classificação da anemia	37
Tabela 4 - Alterações numéricas dos leucócitos	39
Tabela 5 - Alongamento do Tempo de Protrombina e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada	46
Tabela 6 - Sistema ABO.....	47
Tabela 7 - Rotina de controlo diário dos aparelhos da secção de Hematologia.....	49
Tabela 8 - Resultados do hemograma.....	49
Tabela 9 - Testes complementares.....	50
Tabela 10 - Meios de cultura disponíveis no LACSL	54
Tabela 11 - Clinitek Novus™ e UF-1000i.....	56
Tabela 12 - Interpretação do crescimento microbiano na gelose CLED	57
Tabela 13 - Critérios de Murray e Washington	63
Tabela 14 - Interpretação dos esfregaços de Bacilos Ácido-Álcool Resistentes.....	66
Tabela 15 - Microrganismos envolvidos nas infeções genito-urinárias.....	69
Tabela 16 - Cartas de identificação e antibiograma do aparelho Vitek 2-compact	78
Tabela 17 - Antibiograma do <i>Staphylococcus aureus</i> isolado da expetoração.....	80
Tabela 18 - ADVIA® Chemistry I800, ADVIA Centaur® XP, Mini-Vidas e ImmunoCAP® 250	91
Tabela 19 - Técnicas manuais de Serologia.....	92
Tabela 20 - Critérios para a observação de esfregaço de sangue periférico	93
Tabela 21 - Kit Hemacolor®	95
Tabela 22 - Coloração de esfregaço sanguíneo pelo kit Hemacolor®	96
Tabela 23 - Reagentes da coloração de Gram	97
Tabela 24 - Reagentes da coloração de Kinyoun	98

Resumo

Atualmente é incontestável a importância do laboratório clínico na área da saúde, uma vez que os resultados das Análises Clínicas desempenham um papel essencial no diagnóstico clínico e na tomada de decisões médicas. Por estas razões torna-se fundamental uma constante atualização e formação dos profissionais desta área. Além disso, num laboratório de Análises Clínicas, qualidades como o espírito de equipa, a responsabilidade e a transdisciplinaridade são indispensáveis para garantir resultados analíticos fidedignos.

Esta experiência e o presente relatório surgem no âmbito do 2º ano do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. O estágio curricular teve lugar no Laboratório de Análises Clínicas São Lázaro, de janeiro a junho de 2019. Este relatório aborda a dinâmica de trabalho que acompanhei e realizei ao longo das fases pré-analítica, analítica e pós-analítica, e foca com mais detalhe as valências por mim selecionadas, nomeadamente Hematologia e Microbiologia.

Palavras-chave: Análises Clínicas, Hematologia, Microbiologia, Controlo de Qualidade, Patologia Clínica.

Abstract

Currently the importance of the clinical laboratory in the health area is indisputable, since the results of Clinical Analysis play an essential role in clinical diagnosis and medical decision making. For these reasons it is essential to constantly update and train professionals in this area. Beyond that, in a laboratory of Clinical Analysis, qualities such as team spirit, responsibility and transdisciplinarity are indispensable to ensure reliable analytical results.

This experience and the present report arise within the scope of the 2nd year of the Master's degree in Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra. The curricular traineeship took place at the Laboratory of Clinical Analysis of São Lázaro, from January to June 2019. This report addresses the work dynamics that I followed and performed throughout the pre-analytical, analytical and post-analytical phases, and focuses with more detail on the valences I have selected, namely Hematology and Microbiology.

Keywords: Clinical Analysis, Hematology, Microbiology, Quality Control, Clinical Pathology.

I. Introdução

“Take interest, I implore you, in those sacred dwellings which one designates by the expressive term: laboratories. Demand that they be multiplied, that they be adorned. These are the temples of the future - temples of well-being and of happiness. There it is that humanity grows greater, stronger, better.”

Louis Pasteur

(Químico francês, fundador da Microbiologia)

A história do laboratório clínico está relacionada com a evolução da Medicina, desde as técnicas empíricas até às técnicas experimentais. Na verdade, os primeiros diagnósticos clínicos baseavam-se no que os médicos conseguiam ver e ouvir, o que por vezes também incluía a examinação de espécimes humanos. Mais tarde, a criação do microscópio tornou possível a observação da estrutura celular dos tecidos e dos organismos patológicos. Porém, um longo caminho foi percorrido até o laboratório clínico ser reconhecido como um forte aliado da Medicina, uma vez que o seu importante papel na prestação de cuidados de saúde apenas foi legitimado no início do século XX. (Berger, 1999)

À medida que a investigação progride, o conhecimento acerca da vida e da saúde torna-se mais rico. Com este crescimento surgem alterações na farmacoterapia, na monitorização e no diagnóstico clínico, de modo a ser assegurado um aperfeiçoamento progressivo dos serviços e cuidados prestados aos utentes. (Theml, Diem e Haferlach, 2004) Portanto, novas técnicas laboratoriais e meios de diagnóstico surgem com o aprofundamento das funções e doenças do corpo humano, pelo que as Análises Clínicas são uma área em constante mudança e expansão. Atualmente é de realçar a influência da automatização no processamento das amostras biológicas. A introdução da automatização na área das Análises Clínicas aumentou a produtividade e reduziu o número de erros, devido ao decréscimo da intervenção manual. Porém, como não existem tecnologias infalíveis são sempre fulcrais os conhecimentos teóricos, a experiência e uma atitude crítica por parte de todos os profissionais de um laboratório clínico.

Este estágio curricular surgiu no âmbito do 2º ano do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Esta experiência, além de estar na origem deste relatório, também me possibilitou o contacto com a dinâmica de um laboratório de Análises Clínicas e tornou-me mais consciente quanto às funções, responsabilidade e profissionalismo diários de uma equipa que assegura sempre a qualidade dos serviços prestados aos seus utentes.

O Estágio decorreu de janeiro a junho de 2019 e teve lugar no Laboratório de Análises Clínicas São Lázaro (LACSL), sob a orientação do Doutor Pedro Paiva e da Professora Doutora Olga Cardoso. Durante este período de trabalho e aprendizagem, os objetivos a alcançar foram a aquisição de competências como Técnica Superior de Saúde, a aplicação dos conhecimentos teóricos e teórico-práticos apreendidos ao longo do mestrado e a conquista de novas noções acerca das Análises Clínicas. Para tal, durante os meses de estágio frequentei as várias áreas do laboratório (Microbiologia, Química Urinária, Hematologia, Bioquímica, Imunologia/Endocrinologia e Serologia), onde aprendi a trabalhar com os diversos equipamentos, executei as diferentes técnicas manuais e me adaptei à rotina e dinâmica de trabalho.

Neste relatório é realizada a caracterização do local de estágio, bem como uma descrição sucinta da fase pré-analítica e de todas as áreas laboratoriais. De seguida, Hematologia e Microbiologia são abordadas de modo aprofundado, uma vez que foram as valências por mim selecionadas.

2. Caracterização do Laboratório de Estágio

O Laboratório de Análises Clínicas São Lázaro conta com quase 50 anos de existência e é para a cidade de Braga e regiões limítrofes, uma importante referência da qualidade e rigor na área das Análises Clínicas. A Direção Técnica do laboratório encontra-se a cargo do Doutor Duarte Nuno Paiva (Farmacêutico Especialista em Análises Clínicas) e a restante equipa é constituída por profissionais em constante atualização e formação.

De segunda a sábado, o LACSL serve uma rede de dez postos de colheita, presta serviço de domicílio e analisa amostras provenientes de clínicas veterinárias. Em média, o laboratório recebe 300 utentes diários e a maioria pertence ao grupo etário da terceira idade.

O laboratório tem convenção com o Serviço Nacional de Saúde e certas seguradoras de saúde, pelo que presta serviço mediante prescrição médica ou pedido particular do utente.

Na unidade central do laboratório são realizadas diversas análises nas áreas de Hematologia, Bioquímica, Imunologia, Endocrinologia, Serologia e Microbiologia, sendo estas análises de rotina, para monitorização de tratamentos e controlo da evolução do estado clínico dos utentes. Para a realização de análises mais específicas, o LACSL conta com o apoio do Laboratório GDPN - Genética Médica e Diagnóstico Pré-Natal Professor Doutor Sérgio Castedo (Porto) e do Laboratório Cerba Internacional (Barcelona).

A qualidade do serviço e dos resultados é assegurada pelo programa de Controlo de Qualidade Interno e pela participação em programas nacionais e internacionais de Avaliação Externa de Qualidade.

As infraestruturas do LACSL abrangem um total de dez receções (duas no laboratório central e 9 nas unidades de colheita), salas de espera, a zona administrativa, vários gabinetes onde são feitas as colheitas, um armazém, uma câmara de frio, uma sala de esterilização e os espaços das diferentes áreas laboratoriais. Nas várias zonas de trabalho laboratorial, receção e área administrativa é utilizado o sistema informático segilac-Edeia (Slice). Este sistema possibilita a otimização da comunicação e transferência de informação, desde o atendimento dos utentes do laboratório/postos à execução de colheitas, validação dos resultados, emissão de boletins e faturação.

A organização e gestão de resíduos perigosos e não perigosos são desempenhadas segundo o Despacho nº242/96 do Ministério da Saúde. O tratamento dos resíduos do grupo III (resíduos hospitalares de risco biológico) e do grupo IV (resíduos hospitalares específicos) é feito pelo grupo Ambimed[®], sendo de extrema importância para evitar a contaminação ambiental e não constituir um risco para a população. (Edra *et al.*, 2017)

No LACSL são cumpridos os princípios e normas de segurança, proteção e higiene estabelecidos na legislação para os laboratórios de Análises Clínicas, com o propósito de garantir a segurança e o bem-estar dos profissionais do laboratório e dos utentes.

3. Atividades desenvolvidas

3.1. Fase pré-analítica

Nas últimas duas décadas alcançaram-se avanços significativos na compreensão dos erros que acontecem nos laboratórios clínicos. (Carraro, Zago e Plebani, 2012) A verdade é que 70% dos erros ocorrem na fase pré-analítica e são atribuídos a problemas na preparação do utente e a falhas durante a colheita, o transporte, a preparação e o armazenamento das amostras. Estas falhas não podem ser consideradas triviais porque têm um grande impacto na qualidade global das análises. (Lippi *et al.*, 2011; Plebani, 2012)

O primeiro contacto dos utentes com o LACSL consiste na abertura dos seus processos e no registo das análises requisitadas. Nesta primeira fase é gerado um código de barras com o número de identificação (número do processo) e as iniciais do posto de colheita, o qual irá acompanhar todas as amostras do utente. Nestes registos (identificação do utente e pedido de análises), além de estarem disponíveis informações que auxiliam o técnico em

relação à colheita, também estão presentes a data/hora de entrada da requisição e a data prevista para a entrega dos resultados.

3.1.1. Colheitas

Em todos os laboratórios de Análises Clínicas, a preparação do utente para a colheita, o momento da colheita e a receção das amostras são ocasiões muito importantes para o sucesso das fases analítica e pós-analítica. No momento da colheita devem ser sempre verificadas a requisição e as condições de preparação do utente. Por outro lado, na receção das amostras devem ser verificadas as suas condições/identificação e conferida a requisição.

Diversos analitos sofrem alterações fisiológicas ao longo do dia, em função da postura, atividade muscular, estado de repouso, ingestão de alimentos ou inalação de fumo de tabaco. Por este motivo, as colheitas devem ser executadas em condições padronizadas. (Simundic *et al.*, 2018) Para os requisitos pré-analíticos serem garantidos, o diálogo com o utente é fundamental, sendo-lhes transmitidas instruções simples e fornecidos folhetos ilustrativos/informativos que poderão consultar no domicílio.

Qualquer colheita deve ser realizada sob condições de assepsia e com material esterilizado, com o objetivo de prevenir a contaminação com a microbiota saprófita do utente e/ou bactérias presentes no ambiente. (Fonseca *et al.*, 2004) O responsável pela realização da colheita confirma os dados presentes no registo, anota informações clínicas relevantes, quaisquer circunstâncias que surjam durante a colheita (ocorrência de vômito, por exemplo) e, se for o caso, as amostras biológicas em falta. Se não se tratar de uma colheita de sangue, o local do corpo onde foi colhida a amostra deve ser registado e os recipientes claramente identificados.

Após a colheita, as amostras são conferidas e distribuídas pelas diferentes áreas laboratoriais.

3.1.2. Controlo de Qualidade

A política de qualidade do LACSL procura atingir níveis de humanização e excelência que façam do laboratório uma referência, pelo que a qualidade dos resultados fornecidos aos utentes é de extrema importância.

A certificação do sistema de gestão de qualidade é uma garantia da avaliação e melhoria permanente dos serviços. Como tal, o sistema de gestão de qualidade do LACSL encontra-se certificado desde dezembro de 2001 pela norma NP EN ISO 9001:2000 e a transição para versão NP EN ISO 9001:2008 foi efetuada em 2009. Atualmente, após uma revisão do sistema

de gestão de qualidade, o laboratório encontra-se certificado pela norma NP EN ISO 9001:2015.

Diariamente vários procedimentos e tarefas são realizados para garantir o sucesso e qualidade das fases pré-analítica, analítica e pós-analítica, práticas que fazem parte do controlo de qualidade interno e externo.

a. Controlo de Qualidade Interno (CQI)

Com o objetivo de garantir a precisão dos resultados analíticos, o desempenho dos diferentes processos é monitorizado de forma contínua pela prática de um Controlo de Qualidade Interno (CQI). A avaliação do CQI é efetuada pelo responsável de cada setor e supervisionada pelo responsável da qualidade.

O plano de CQI consiste em rotinas de controlo e manutenção diárias, semanais e mensais, aplicadas às técnicas e equipamentos de todas as áreas laboratoriais. A eficácia do plano de controlo da qualidade é monitorizada através do programa Unity Real Time (Bio-Rad). Este sistema de controlo permite identificar e avaliar os erros que afetam as amostras controlo e as amostras dos utentes. Em caso de erro são tomadas ações corretivas para prevenir e minimizar a probabilidade e/ou o impacto de resultados adulterados. Neste sentido, as rotinas de CQI possibilitam o aperfeiçoamento contínuo da qualidade das análises. (Nichols, 2011)

b. Controlo de Qualidade Externo (CQE)

A exatidão dos resultados é assegurada pela participação em vários programas de Avaliação Externa de Qualidade de instituições nacionais e estrangeiras, entre as quais se destacam o INSA (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge), Labquality (Helsínquia – Finlândia), UKNEQAS (United Kingdom National External Quality Assessment Schemes) (Reino Unido), RIQAS (Randox International Quality Assessment Scheme) (Reino Unido) e a SEQC (Sociedade Espanhola de Química Clínica) (Espanha).

Nestas avaliações, as amostras enviadas ao laboratório pelas diferentes entidades são processadas e os resultados obtidos são reportados dentro dos prazos estipulados. A avaliação dos resultados emitidos pelo LACSL resulta na produção de relatórios pelas instituições externas, os quais devem ser partilhados com a equipa técnica, com o objetivo de serem corrigidas eventuais falhas e implementadas as melhorias necessárias.

3.2. Fase analítica

O processamento das amostras tem início após ser dada a sua entrada no sistema informático e realizado o controlo de qualidade.

Como a maioria dos aparelhos estão ligados a computadores é possível a transferência dos resultados, em tempo real, dos analisadores para o sistema informático.

Nos setores de Bioquímica e Imunologia/Endocrinologia do LACSL, o aumento da eficácia e produtividade é garantido pelo WorkCell (Siemens), uma cadeia automatizada de distribuição de soros que reúne os aparelhos ADVIA 1800 (Siemens) e ADVIA Centaur XP (Siemens). O CentraLink é o software da célula de trabalho que possibilita a monitorização do funcionamento dos aparelhos e que garante uma maior agilidade na gestão das tarefas e dos resultados analíticos.

Na secção de Bioquímica são processadas amostras de soro e urina para monitorização e diagnóstico de certos parâmetros bioquímicos, através do analisador automatizado ADVIA 1800 (**Anexo I**). Na urina é realizada a deteção qualitativa de drogas de abuso (anfetaminas, canabinoides, cocaína e opiáceos), através de testes imunocromatográficos em cassete (Sure Step™). No aparelho Cappillarys (Sebia) é determinado o perfil proteico através da separação das proteínas do soro em seis frações principais (gama-globulinas, beta-1-globulinas, beta-2-globulinas, alfa-1-globulinas, alfa-2-globulinas e a albumina). O estudo dos gases, eletrólitos e metabólitos no sangue arterial é realizado pelo sistema de gasometria epoc® (Siemens) e os principais parâmetros determinados são o pH, a pressão parcial de oxigénio, a pressão parcial de dióxido de carbono, a concentração de bicarbonato e a saturação do oxigénio.

Em Imunologia e Endocrinologia são principalmente analisadas amostras de soro. Através do analisador ADVIA Centaur XP são analisados parâmetros do foro imunoquímico, hormonas, marcadores séricos de doenças infecciosas e marcadores tumorais (**Anexo I**). O analisador Mini-Vidas (bioMérieux) faz o doseamento da vitamina D e de marcadores séricos associados a estados infecciosos (**Anexo I**). O aparelho ImmunoCAP® 250 (Phadia) realiza a determinação qualitativa e semiquantitativa de anticorpos específicos de alérgenos responsáveis por diferentes doenças alérgicas, perturbações gastrointestinais e doenças pulmonares (**Anexo I**). Além disso, este aparelho também deteta anticorpos antinucleares (ANA) e outros anticorpos importantes para o diagnóstico de várias doenças auto-imunes (**Anexo I**). O analisador Heliprobe® (iberlab & imunoreage) permite diagnosticar infeções do trato gastrointestinal causadas por *Helicobacter pylori*, através de um teste respiratório não invasivo.

Em Serologia, a pesquisa de anticorpos associados a várias patologias/doenças infecciosas efetua-se através de diferentes técnicas manuais (teste de Coombs, VDRL (Venereal Disease Research Laboratory), TPHA (Treponema Pallidum Particle Agglutination Assay), entre outras) (**Anexo II**).

No setor de Química Urinária, as amostras de urina são processadas pelos aparelhos automatizados Clinitek Novus™ (Siemens) e UF-1000i (Sysmex). O analisador químico Clinitek Novus™ analisa certos parâmetros bioquímicos e o sedimento urinário (urina tipo II). O aparelho UF-1000i realiza a contagem de células epiteliais, eritrócitos, leucócitos, cilindros e bactérias. A pesquisa da hormona gonadotrofina coriônica humana (β -hCG) na urina (teste de gravidez) efetua-se com recurso às tiras InstAlert™ (Innovacon) (teste imunocromatográfico). Nesta área laboratorial também se realiza a pesquisa de sangue oculto nas fezes, através do teste imunocromatográfico em cassete Nadal® Fob.

Em Hematologia, os estudos realizados através de amostras de sangue total são o hemograma com contagem de plaquetas/reticulócitos (Sysmex XT-4000i - Sysmex), a velocidade de sedimentação dos eritrócitos (Ves-Matic Cube 200 - DIESSE) e a análise da hemoglobina glicada (ADAMS HA 8160 - Arkray). Nas provas de coagulação sanguínea (Sysmex CA-660 - Siemens) são utilizadas amostras de plasma e a interpretação dos resultados realiza-se através dos tempos de protrombina e tromboplastina.

Em Microbiologia são realizados exames diretos a fresco e após coloração (Gram e/ou Kinyoun), bem como exames culturais. A identificação e o antibiograma dos microrganismos isolados são determinados pelo aparelho automatizado Vitek 2-compact (bioMérieux). Além disso, também são executadas diferentes técnicas manuais para a identificação e diferenciação microbianas. Nesta secção, os espermogramas são realizados pelo aparelho SQA-S Gold (Medical Electronic Systems). Em primeiro lugar realiza-se o exame direto do esperma e certos parâmetros são avaliados, nomeadamente o pH e leucócitos (tiras reativas de Combur - Roche), a viscosidade e o volume. O analisador avalia vários parâmetros, como o número, a morfologia, a mobilidade e a concentração de espermatozoides.

Para assegurar a eficácia do trabalho laboratorial, o LACSL também está equipado com microscópios (ótico e de fluorescência), centrífugas, uma câmara de fluxo laminar, um vórtex e um contador manual de células sanguíneas.

Caso existam pedidos de testes que não são realizados no laboratório, as amostras são separadas, refrigeradas ou congeladas, e enviadas aos laboratórios externos.

De seguida, as áreas de Hematologia e Microbiologia serão abordadas com mais detalhe.

3.2.1. Hematologia

Muitas civilizações partilham crenças sobre as “qualidades mágicas” do sangue. Como a sua perda incontrolada pode conduzir à morte, este tecido tem sido considerado a “essência da vida”. A verdade é que o estudo do sangue permitiu descobrir muitas das suas características, esclareceu várias das suas funções e qual a sua importância. Além de defender o organismo, o sangue é responsável pela distribuição de calor, manutenção da homeostase, remoção de resíduos das células e pelo fornecimento de oxigénio e nutrientes. (OpenStax College, 2013) Com efeito, o diagnóstico hematológico qualitativo e quantitativo muito pode explicar acerca do nosso estado de saúde. (Seeley, Stephens e Tate, 2005)

O sangue é um tipo de tecido conjuntivo constituído por células e fragmentos celulares (elementos figurados) rodeados por uma matriz líquida (plasma). Os elementos figurados constituem cerca de 45% e o plasma 55% do volume total de sangue. (Seeley, Stephens e Tate, 2005) O plasma torna o sangue um tecido único porque a sua fluidez, devido sobretudo à presença de água, suspende os elementos figurados e possibilita a sua circulação por todo o corpo, através do sistema cardiovascular. (OpenStax College, 2013)

O processo de produção dos elementos figurados do sangue designa-se por hematopoiese. Nas primeiras semanas de gestação, o principal local de hematopoiese é o saco vitelino. Mais tarde, a hematopoiese definitiva ocorre a partir de uma população de células indiferenciadas conhecidas por células estaminais hematopoiéticas (**Figura 1**). A partir das 6 semanas até aos 6 a 7 meses de vida fetal, os principais órgãos onde este processo acontece são o fígado e o baço. Ao longo da infância e vida adulta, a medula óssea torna-se o mais importante órgão hematopoiético. Como durante a infância há uma progressiva substituição da medula dos ossos longos por gordura, os locais de hematopoiese no adulto localizam-se apenas nas vértebras, costelas, crânio, esterno, sacro, pelve e nas extremidades proximais do fémur e úmero. (Hoffbrand e Moss, 2011)

Após receberem sinais químicos específicos, as células estaminais hematopoiéticas são capazes de se dividirem e diferenciarem em células progenitoras mieloides e linfoides. A partir das células progenitoras mieloides desenvolvem-se os eritrócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e plaquetas (**Figura 1**). As células progenitoras linfoides originam os linfócitos (B, T e células *Natural Killer*) (**Figura 1**). (Seeley, Stephens e Tate, 2005)

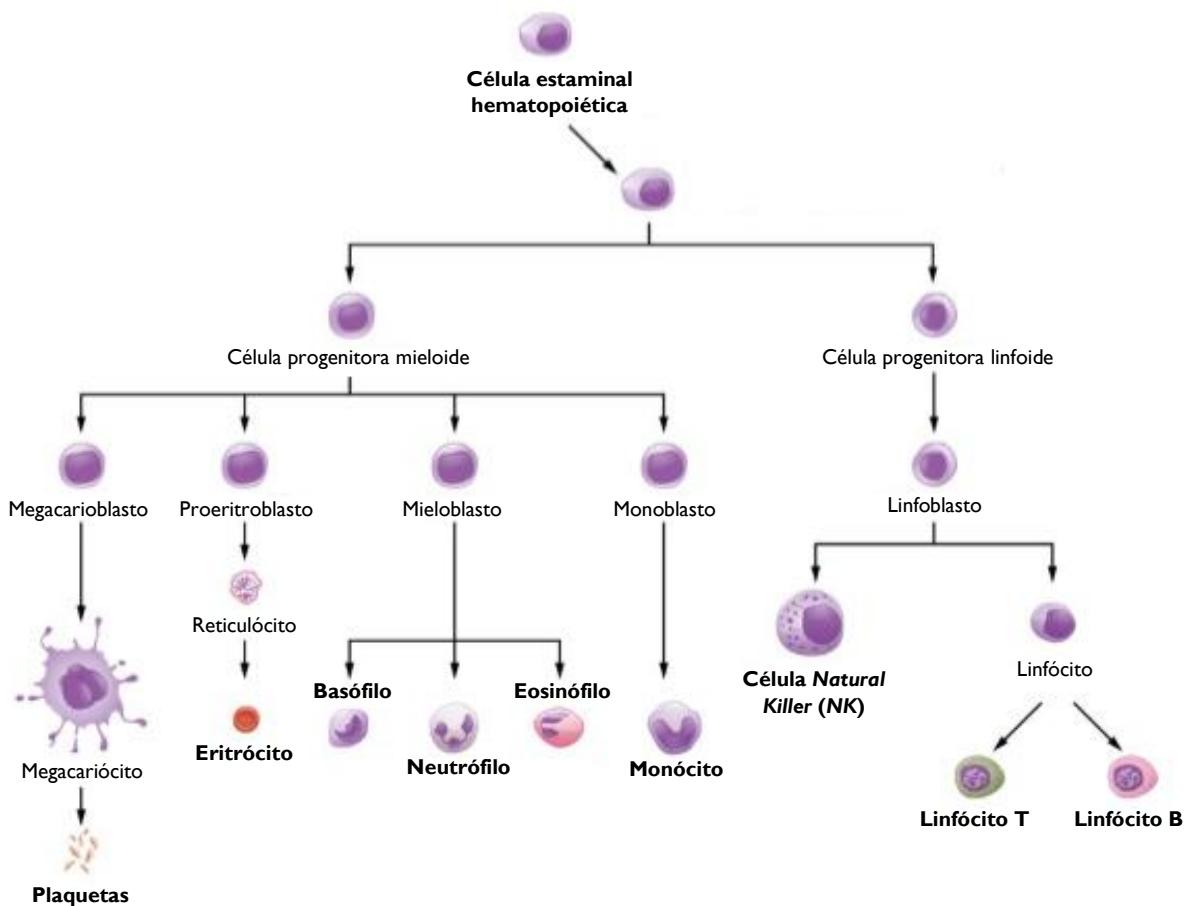


Figura I - O processo de hematopoiese. As células estaminais hematopoiéticas originam as linhas celulares que produzem os elementos figurados do sangue. *Adaptado de:* OpenStax College - Anatomy & Physiology (2013).

a. Colheita

Antes de uma colheita de sangue é recomendado um jejum prévio de 6 a 8 horas. Na maioria dos casos, a amostra é colhida através da punção de uma veia antecubital por intermédio de um sistema de vácuo. (Simundic *et al.*, 2018) No momento da colheita, o garrote deve ser aplicado no menor período de tempo possível e aliviado assim que a agulha é introduzida na veia. Com esta prática evita-se a estase venosa responsável por alterações nas contagens celulares. Por outro lado, a pressão aplicada com o garrote não deve ser excessiva para evitar a hemólise das amostras. (Lima-Oliveira *et al.*, 2015)

Os tubos de vácuo são diferenciados pelas cores das tampas, aspecto que auxilia na sua correta seleção (**Tabela I**). Depois do enchimento procede-se à homogeneização dos tubos, através de sucessivas inversões, para se garantir uma mistura suave dos componentes, evitar a hemólise das amostras ou a formação de coágulo. (Simundic *et al.*, 2018) Os tubos utilizados para obter plasma devem ser centrifugados (centrífuga Megafuge 1.0 Heraeus Sepatech) o mais brevemente possível, a 3500 rotações por minuto (r.p.m.) durante 10 minutos. Com esta

prática, as células sanguíneas são separadas do componente não celular do sangue total não coagulado (plasma).



a.1. Anticoagulantes

Na colheita de plasma ou sangue total são usados anticoagulantes que bloqueiam a cascata de coagulação (**Tabela I**). (Burtis e Bruns, 2014)

O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) é um agente quelante de catiões divalentes, como o cálcio, e permite obter sangue total ou plasma. Este anticoagulante é útil nos estudos hematológicos porque tem a capacidade de preservar os componentes celulares do sangue. (Burtis e Bruns, 2014)

O citrato de sódio atua através da quelação do cálcio e tem como finalidade a formação de plasma. A solução de citrato de sódio é muito aplicada nas provas de coagulação, uma vez que o seu efeito anticoagulante é revertido pela adição de cálcio ao plasma. (Burtis e Bruns, 2014)

Tabela I - Tubos utilizados na colheita de sangue total e plasma, no LACSL

Cor da tampa	Capacidade (mL)	Anticoagulante	Amostra	Aplicação
	2,7	Citrato de sódio 3,2%	Plasma	Provas de coagulação
	3	EDTA	Sangue total ou plasma	Hemograma, velocidade de sedimentação e hemoglobina glicada

EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético).

b. Hemograma com contagem de plaquetas

O hemograma é um dos pedidos mais solicitados nas análises de rotina. (Grotto, 2009) Apesar do hemograma ser uma análise inespecífica e com poder diagnóstico limitado, a diversidade de informações que pode fornecer constitui uma ferramenta útil na apreciação de várias situações. O hemograma é importante no diagnóstico de doenças hematológicas, na detecção de infecções e na monitorização terapêutica, caso se conheçam as funções celulares e as bases fisiopatológicas das doenças. Para um correto diagnóstico das patologias relacionadas com o sangue e/ou a medula óssea é importante associar os resultados quantitativos às características morfológicas das células sanguíneas e ao conhecimento acerca das alterações da hematopoiese. (Direção-Geral da Saúde, 2013)

No LACSL, o hemograma com contagem de plaquetas é realizado através do analisador automatizado Sysmex XT-4000i (Sysmex). Este aparelho permite contar, diferenciar e classificar populações de leucócitos, eritrócitos e plaquetas. Neste analisador, antes de serem introduzidas as *racks* com as amostras, os tubos de sangue devem ser bem homogeneizados.

b.1. Eritrócitos

Os eritrócitos são os elementos figurados mais numerosos em circulação. (Seeley Stephens e Tate, 2005) Estas células não têm núcleo, apresentam em média um diâmetro de 7,5 micrómetros (μm) e uma forma em disco bicôncavo (a porção periférica é mais espessa do que o centro da célula). Esta forma otimiza a relação entre a área de superfície e o volume do eritrócito, o que facilita as trocas gasosas e a sua mobilidade através dos vasos sanguíneos de pequeno calibre. (OpenStax College, 2013) O principal componente do eritrócito é a hemoglobina, uma proteína pigmentada responsável pela sua cor vermelha. (Seeley, Stephens e Tate, 2005) A principal função da hemoglobina é o transporte de oxigénio aos tecidos e o retorno de dióxido de carbono dos tecidos aos pulmões. (Hoffbrand e Moss, 2011)

Os eritrócitos são analisados pelo detetor de eritrócitos, através do método de focagem hidrodinâmica. A análise dos eritrócitos é realizada através da passagem das células por uma corrente direta de modo isolado, o que gera um pequeno pulso devido ao aumento da impedância. A altura do pulso é proporcional ao volume da célula e, além de dar indicações quanto ao volume, também fornece informações sobre o número de eritrócitos. A focalização hidrodinâmica força a passagem de todas as células pelo trajeto central do orifício de deteção, o que impede a formação de pulsos distorcidos que não correspondem a um verdadeiro volume celular. Neste sentido, o método de focagem hidrodinâmica fornece uma medição mais precisa da distribuição do volume dos eritrócitos. (Handin, Lun e Stossel, 2003)

O hematócrito corresponde à percentagem de volume total de sangue composta por eritrócitos. (Seeley, Stephens e Tate, 2005) O hematócrito é calculado com base no volume medido pelo método de deteção de corrente direta. Como a altura do pulso de cada eritrócito é proporcional ao volume de cada célula, o valor do hematócrito é gerado pelas alturas dos pulsos cumulativos de todos os eritrócitos.

O Volume Corpuscular Médio (VCM) e o Índice de Distribuição dos Eritrócitos (RDW - Red Cell Distribution Width) são determinados por cálculo. O VCM (em femtolitros - fL) é calculado através da divisão do hematócrito pelo número de eritrócitos. O RDW deriva da análise da altura de pulso e pode ser expresso como o desvio padrão (fL) ou como o coeficiente de variação (%) das medidas do volume dos eritrócitos. (Bain *et al.*, 2017)

b.2. Hemoglobina

Cada eritrócito possui cerca de 640 milhões de moléculas de hemoglobina. A síntese desta proteína especializada inicia-se com a formação do grupo heme. No interior do eritrócito, após se formar um tetrâmero (quatro cadeias de globina, cada uma com o seu grupo heme) é obtida uma molécula de hemoglobina. (Hoffbrand e Moss, 2011) Associado a cada molécula heme está um íon de ferro (Fe^{2+}) que, por sua vez, pode ligar-se ao oxigênio. Assim, cada molécula de hemoglobina pode transportar quatro moléculas de oxigênio. (OpenStax College, 2013)

A partir dos 3 a 6 meses de idade, a hemoglobina A (Hb A) é dominante e consiste em quatro cadeias polipeptídicas $\alpha_2\beta_2$. Porém, no sangue do adulto também existem pequenas quantidades de hemoglobina fetal (Hb F) (cadeias $\alpha_2\gamma_2$) e hemoglobina A2 (Hb A2) (cadeias $\alpha_2\delta_2$). (Hoffbrand e Moss, 2011)

A determinação da concentração da hemoglobina é feita após a lise dos eritrócitos e pela ação do reagente laurilsulfato de sódio (SLS). Numa primeira fase, o grupo hidrofóbico do SLS atua sobre a globina e ocorrem mudanças conformacionais nesta proteína (desnaturação da globina). De seguida, o ferro (Fe^{2+}) do grupo heme é oxidado, passando do estado ferroso ao estado oxidado ($Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$). Ao Fe^{3+} liga-se o grupo hidrofílico do SLS, formando-se um produto estável que é analisado por espectrofotometria. (Borges e Siqueira, 2009)

A Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e a Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) são parâmetros obtidos através de cálculo. A HCM (em picogramas - pg) deriva do quociente entre a hemoglobina e o número de eritrócitos e a CHCM (em gramas por litro - g/L) é obtida através da divisão da hemoglobina pelo hematócrito. (Bain *et al.*, 2017)

b.3. Leucócitos

Os principais componentes das defesas do organismo são os leucócitos, uma vez que protegem contra microrganismos invasores, removem células mortas e corpos estranhos. (Seeley *et al.*, 2005)

Apesar de serem menos numerosos que os eritrócitos, os leucócitos são maiores e os únicos elementos figurados que possuem núcleo e organelos. (OpenStax College, 2013) Os leucócitos que possuem núcleo lobado e abundantes grânulos citoplasmáticos são denominados por granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) (**Tabela 2**). Os agranulócitos (monócitos e linfócitos) apresentam um núcleo sem lóbulos distintos e grânulos

muito pequenos, não visíveis com facilidade ao microscópio ótico (**Tabela 2**). (Seeley, Stephens e Tate, 2005)

A determinação da fórmula leucocitária baseia-se na técnica de citometria de fluxo, utilizando um laser semiconductor. Nesta técnica, anticorpos marcados com fluorocromos reconhecem o padrão e a intensidade de expressão de diferentes antígenos na superfície das células. O princípio da citometria de fluxo baseia-se na condução das células em direção a um ponto de análise (ou *flow cell*), onde é aplicado um laser semiconductor, com um comprimento de onda (λ) de 633 nanômetros (nm), o qual permite quantificar e diferenciar os elementos figurados. (Borges e Siqueira, 2009)

Os neutrófilos, basófilos, linfócitos, eosinófilos e monócitos são analisados num canal diferencial, através das características de cada grupo e após a interação com um corante fluorescente. Neste canal são medidas a dispersão lateral da luz (fornece informações acerca da estrutura interna da célula), a dispersão frontal (indica o tamanho da célula) e a intensidade de fluorescência (informações acerca do núcleo - concentração em DNA e RNA). Num outro canal ocorre a lise de todas as células, com exceção dos basófilos. Deste modo, os basófilos podem ser diferenciados dos demais leucócitos através da dispersão da luz frontal e lateral. (Borges e Siqueira, 2009)






b.4. Plaquetas

Os megacariócitos são células de grandes dimensões e os fragmentos do seu citoplasma estão na origem das plaquetas. As plaquetas são pequenas (2 a 4 μm de diâmetro), numerosas e contêm grânulos. Estes elementos figurados são críticos para o sistema hemostático e para o controlo do fluxo sanguíneo, dado que estão envolvidos na libertação de substâncias químicas necessárias à coagulação do sangue e na formação de agregados plaquetários. (OpenStax College, 2013)

A contagem plaquetária é efetuada no mesmo canal e com uma metodologia igual à aplicada na análise dos eritrócitos (método de focagem hidrodinâmica com deteção direta). No entanto, as plaquetas também podem ser analisadas por um método ótico, no canal de reticulócitos, após marcação com um corante fluorescente. Quando o número de plaquetas é reduzido, a contagem ótica permite melhorar a exatidão e precisão da análise. (Bacall, 2009)

Os índices plaquetários também são determinados por cálculo, nomeadamente o VMP (Volume Plaquetário Médio), o Índice de Dispersão das Plaquetas (IDP/PDW) e o “plaquetómetro” (plaquetas por volume de sangue). Estes parâmetros servem de auxílio na avaliação das alterações plaquetárias e de outras condições patológicas.

Tabela 2 - Características e funções dos leucócitos granulares e agranulares

Tipo de célula	Características	Funções
<p>Neutrófilo (50 a 70%)</p> 	<p>Núcleo segmentado (dois ou quatro lobos) e, quando corado, o seu citoplasma é rosa avermelhado ou púrpura devido à presença de granulação fina; 10 a 12 μm de diâmetro.</p>	<p>Fagocitose de microrganismos e outras substâncias.</p>
<p>Basófilo (0 a 1%)</p> 	<p>Núcleo bilobado; grandes grânulos citoplasmáticos; 10 a 12 μm de diâmetro.</p>	<p>Libertação de histamina que promove a inflamação e heparina que evita a formação de coágulos.</p>
<p>Eosinófilo (2 a 4%)</p> 	<p>Núcleo tem dois a três lobos; quando corados, os seus grânulos citoplasmáticos são laranja ou vermelho; 11 a 14 μm de diâmetro.</p>	<p>Libertação de mediadores químicos que reduzem a inflamação; combate alguns tipos de parasitas.</p>
<p>Linfócito (20 a 30%)</p> 	<p>Núcleo redondo; o citoplasma forma um fino anel em redor do núcleo; Linfócitos maiores têm 10 a 14 μm de diâmetro e células menores têm 6 a 9 μm de diâmetro.</p>	<p>Consoante o tipo de linfócito (B, T ou célula NK), as funções desempenhadas são distintas: produzem anticorpos e outros mediadores químicos que destroem microrganismos, contribuem para as reações alérgicas, rejeição de enxertos, controlo de tumores e regulação do sistema imunitário.</p>
<p>Monócito (2 a 8%)</p> 	<p>Núcleo grande, em forma de rim ou ferradura; contém mais citoplasma que o linfócito; 12 a 20 μm de diâmetro.</p>	<p>Quando sai da circulação sanguínea origina um macrófago e realiza a fagocitose de bactérias, células mortas, fragmentos celulares e outros corpos estranhos; o macrófago também liberta defensas antimicrobianas e moléculas quimiotáticas que atraem outros leucócitos até ao local de infeção.</p>

Adaptado de: Seeley, R. R.; Stephens, T. D.; Tate, P. - Anatomia & Fisiologia (2005). Nota: As ilustrações não estão à escala.

c. Esfregaço de sangue periférico

O estudo morfológico do sangue periférico efetua-se sempre que requisitado ou devido a alterações inesperadas nas contagens celulares e/ou índices hematimétricos. Através da observação do esfregaço são avaliadas as contagens automáticas e detetadas alterações celulares de interesse clínico, nem sempre identificadas pelo aparelho.

No **Anexo III** estão presentes as recomendações da Direção-Geral da Saúde (DGS) e os critérios estabelecidos no LACSL para a execução de um esfregaço de sangue periférico.

No LACSL, os esfregaços são preparados manualmente (**Anexo IV**) a partir de amostras de sangue total em EDTA, o que possibilita uma distribuição uniforme das plaquetas. A preparação de um esfregaço fino impede a sobreposição das células e facilita a observação ao microscópio ótico. Após ser fixado, o esfregaço é corado pelo *kit* Hemacolor® (**Anexo IV**) que se baseia no método de Pappenheim. Nesta coloração, um corante básico (azure B) confere uma cor azul ou azul-violeta aos ácidos nucleicos (através da ligação aos grupos fosfato do DNA e RNA), às nucleoproteínas e aos grânulos de basófilos/neutrófilos/plaquetas. Por outro lado, um corante ácido (eosina Y) transmite uma cor vermelha à hemoglobina e aos grânulos de eosinófilos. A eosina Y também se liga à proteína nuclear catiónica, pelo que contribui para a coloração do núcleo das células. (Bain, 2006) Neste *kit*, a solução *buffer* com pH 7.2 garante a estabilidade da coloração e resultados livres de precipitação.

Quando os esfregaços sanguíneos são visualizados ao microscópio ótico (Nikon Labophot), o campo é focado com a objetiva de 10X e os eritrócitos, leucócitos, plaquetas e agregados plaquetários são observados com a objetiva de imersão (100X).

d. Alterações dos elementos figurados

d.1. Alterações nos eritrócitos

A ocorrência de alterações quantitativas e qualitativas nos eritrócitos e moléculas de hemoglobina pode ter um grande impacto na nossa saúde. (OpenStax College, 2013)

A produção reduzida ou defeituosa de eritrócitos, a destruição excessiva deste elemento figurado e a perda de sangue são condições que podem provocar anemia. A anemia é definida como a diminuição da concentração de hemoglobina do sangue abaixo dos valores de referência para o sexo e a idade. Esta diminuição é normalmente acompanhada por uma baixa contagem de eritrócitos e por um decréscimo do hematócrito. (Hoffbrand e Moss, 2011)

A avaliação dos índices hematimétricos dos eritrócitos permite dividir e classificar as anemias. Consoante o resultado do VCM, as anemias são classificadas em microcíticas, normocíticas e macrocíticas (**Tabela 3**). (Hoffbrand e Moss, 2011) Tendo em conta a

concentração de hemoglobina presente nos eritrócitos (CHCM), as anemias são divididas em hipocrômicas e normocrômicas (**Tabela 3**). Por outro lado, o RDW permite avaliar a variação do tamanho dos eritrócitos. O aumento deste parâmetro está relacionado com o fenômeno de anisocitose, no qual estão presentes micróцитos, macróцитos ou ambos. (Bain, 2006)

O esfregaço de sangue periférico é necessário em todos os casos de anemia, uma vez que a observação de eritrócitos com diferentes formas (poiquilocitose) e tamanhos (anisocitose) pode sugerir um diagnóstico particular. No esfregaço da **Figura 2** são observadas células em alvo, dacriócitos e células em lápis. O termo célula em alvo (**Figura 2A**) refere-se a uma célula em que se observa uma faixa periférica de hemoglobina e uma área central mais corada do que o normal (aparência em alvo). Esta anomalia surge devido a uma desproporção entre a área de superfície e o volume do eritrócito e pode ser encontrada em situações de hipobetalipoproteinemia hereditária, anemia por deficiência de ferro, talassemias e hepatopatias. Por outro lado, verificou-se que o número de dacriócitos e eliptócitos correlaciona-se com a gravidade da anemia por deficiência de ferro. Os dacriócitos (**Figura 2B**) são células em forma de lágrima e também são observados em casos de mielofibrose e hematopoiese extramedular. As células em lápis (**Figura 2C**) têm uma forma elíptica e ocorrem principalmente em anemias por deficiência de ferro. (Bain *et al.*, 2017) Além destas variações eritrocitárias, outras anomalias podem ser detetadas em várias condições patológicas, nomeadamente acantócitos, equinócitos, fragmentos, células falciformes, estomatócitos e inclusões (corpos de Howell-Jolly, corpúsculos de Pappenheimer, pontilhado basófilo). (Hoffbrand e Moss, 2011)

A determinação de outros parâmetros analíticos é essencial para complementar as informações fornecidas pelo hemograma/esfregaço e para confirmar a causa de anemia. Alguns dos testes complementares ao hemograma incluem a contagem de reticulócitos, o doseamento de vitamina B₁₂ e ácido fólico, a avaliação da função renal e da eficácia do metabolismo do ferro. (Bain, 2006)

Por outro lado, o aumento do número de eritrócitos resulta numa anomalia designada por eritrocitose. Em caso de desidratação ocorre uma diminuição do volume plasmático e um aumento do hematócrito, pelo que a contagem de eritrócitos corresponde a um falso aumento. (OpenStax College, 2013) Por fim, a policitemia vera é uma patologia rara caracterizada pela transformação maligna e proliferação clonal de células estaminais hematopoiéticas. Nesta patologia, além do aumento do eritrograma, também se verifica uma produção excessiva de leucócitos e plaquetas. O aumento da massa eritrocitária resulta no aumento da viscosidade do sangue e a alta contagem de plaquetas pode contribuir para a

formação de trombos. Outros testes são necessários para confirmar o diagnóstico de policitemia vera, como o doseamento de eritropoietina, medulograma e testes genéticos. O medulograma e a análise genética não estão disponíveis em grande parte dos laboratórios da comunidade. (Raedler, 2014)

Tabela 3 - Classificação da anemia

Microcítica, hipocrômica	Normocítica, normocrômica	Macrocítica
VCM < CHCM <	VCM Normal CHCM Normal	VCM >
Deficiência de ferro, talassemias, certos casos de anemia de doença crônica, intoxicação por chumbo e alguns casos de anemia sideroblástica	Várias anemias hemolíticas, alguns casos de anemia de doença crônica, anemia pós-hemorrágica aguda, deficiências mistas, nefropatias e insuficiência da medula óssea	Anemia megaloblástica: deficiências de vitamina B ₁₂ e folato; não megaloblástica: alcoolismo, hepatopatias, anemia aplástica, mielodisplasias, etc.

Adaptado de: Hoffbrand, A. V. e Moss, P. A. H. - Essencial haematology (2011).

CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média), **VCM** (Volume Corpuscular Médio). < (VCM/CHCM abaixo dos valores de referência para o sexo e idade), > (VCM/CHCM acima dos valores de referência para o sexo e idade).

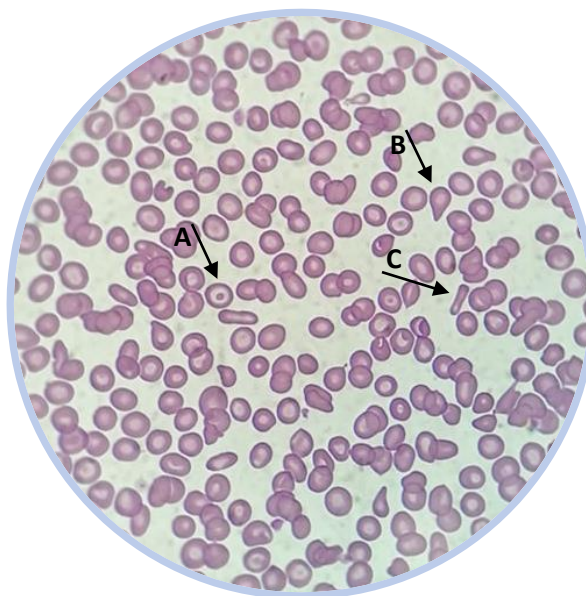


Figura 2 - Esfregaço de sangue periférico com algumas das anomalias eritrocitárias que podem ser observadas em diferentes anemias (fotografado no LACSL). Neste campo (observado com a objetiva de imersão) estão presentes células em alvo (**2A**), dacriócitos (**2B**) e células em forma de lápis (**2C**). As células em alvo podem ser causadas por deficiência de ferro, hepatopatia, hemoglobinopatia e pós-esplenectomia; os dacriócitos por mielofibrose e hematopoiese extramedular; e as células em lápis podem formar-se devido a uma deficiência de ferro.

d.2. Alterações nos leucócitos

Alterações quantitativas (valores absolutos ou relativos) ou qualitativas dos leucócitos podem ocorrer em resposta a distúrbios locais ou sistémicos. (Bain *et al.*, 2017)

Se o número total de leucócitos é superior aos valores de referência para o sexo e idade, a condição é denominada por leucocitose. Quando se trata de uma diminuição na contagem de leucócitos em relação aos valores de referência, a condição designa-se por leucopenia. (OpenStax College, 2013) Em ambos os casos, as alterações devem ser interpretadas em conjunto com os resultados da contagem diferencial (**Tabela 4**).

Em infeções bacterianas ou virais, no esfregaço de sangue periférico são observados linfócitos atípicos. A presença de neutrófilos com uma coloração mais densa e um possível aumento do número de grânulos (“granulação tóxica”) pode ocorrer numa infeção bacteriana ou noutras condições que causam inflamação. Neutrófilos hipogranulares e agranulares ocorrem nas síndromes mielodisplásicas e em algumas formas de leucemia mieloide. Por outro lado, a observação de neutrófilos hipersegmentados é um importante achado para o diagnóstico das anemias megaloblásticas. (Bain *et al.*, 2017)

Nas neoplasias hematológicas, as linhagens leucocitárias são afetadas com maior frequência. (Bain *et al.*, 2017)

A leucemia é uma doença maligna progressiva com origem na medula óssea, caracterizada pela proliferação e desenvolvimento anormais dos leucócitos e seus precursores, na medula óssea e no sangue. Pode ser classificada como aguda ou crónica, de acordo com o grau de diferenciação celular, e como mieloide ou linfocítica, de acordo com o tipo predominante de célula envolvida (mieloide ou linfoide). (Davis, Viera e Mead, 2014)

No esfregaço de sangue periférico, quando são observados blastos (células precursoras hematopoiéticas) deve-se suspeitar de leucemia aguda. Por outro lado, as Sombras Nucleares de Grumprecht (**Figura 3**) são linfócitos lisados comumente observados em utentes com leucemia linfocítica crónica. As Sombras Nucleares de Grumprecht formam-se durante a preparação do esfregaço, devido ao aumento da fragilidade dos linfócitos nesta patologia. (Dusse *et al.*, 2013)

Os linfomas são um grupo de malignidades que surgem de linfócitos B ou T maduros, em órgãos linfoides secundários. (Zappasodi, Braud e Nicola, 2015) Os principais tipos são os linfomas de Hodgkin e linfoma não-Hodgkin, os quais são classificados consoante os tipos de células e padrão de crescimento nos nódulos linfáticos. (Hoffbrand e Moss, 2011)

Um diagnóstico definitivo das leucemias e linfomas implica testes mais específicos, como o medulograma, biópsia dos nódulos linfáticos no caso dos linfomas, análise citogenética e imunofenotipagem. (Hoffbrand e Moss, 2011)

Tabela 4 - Alterações numéricas dos leucócitos

Tipo de célula	Alteração numérica	Significado clínico	Referências
Neutrófilo	↑	Infeções agudas, inflamação, queimaduras, gravidez, stress, perda aguda de sangue, terapia com corticosteroides.	OpenStax College, 2013 Bain et al., 2017
	↓	Infeção, doenças auto-imunes, leucemia, toxicidade de certos fármacos (agentes anticancerígenos, em particular).	
Basófilo	↑	Doenças mieloproliferativas, alergias, infeções parasitárias, hipotireoidismo.	
	↓	Gravidez, hipertireoidismo, stress (cirurgia, trauma e infeção).	
Eosinófilo	↑	Alergias, infeções parasitárias, doenças auto-imunes.	
	↓	Toxicidade desencadeada por drogas, stress.	
Linfócito	↑	Infeções virais, alguns tipos de cancro.	
	↓	Terapia com esteroides, falha renal, doença crónica ou imunossupressão, incluindo infeção por HIV.	
Monócito	↑	Infeções virais ou fúngicas, inflamação, algumas formas de leucemia, doenças crónicas.	
	↓	Supressão da medula óssea.	

HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana).

↑ (Aumento em relação aos valores de referência para o sexo e idade), ↓ (Diminuição em relação aos valores de referência para o sexo e idade).

d.3. Alterações nas plaquetas

A perda crónica de sangue, destruição de eritrócitos e esplenectomia podem causar um aumento no número de plaquetas (trombocitose). A trombocitose é detetada de modo frequente em condições infecciosas e inflamatórias, como a osteomielite e a artrite reumatoide. Uma elevação persistente na contagem de plaquetas caracteriza a trombocitemia primária. Esta condição pertence ao espectro das doenças mieloproliferativas e está associada a complicações trombóticas ou hemorrágicas. A análise citogenética e a avaliação da medula

óssea (pesquisa de megacariócitos anormais) são essenciais para confirmar o diagnóstico. (Bain *et al.*, 2017)

A trombocitopenia ocorre quando o número de plaquetas está abaixo dos valores de referência (trombocitopenia), sendo um achado isolado comum. Uma falsa trombocitopenia (pseudotrombocitopenia) é provocada pela presença de coágulos na amostra, agregação de plaquetas e satelitismo plaquetário (plaquetas que aderem a neutrófilos). De outro modo, uma real redução no número de plaquetas está relacionada com a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), quimioterapia, presença de autoanticorpos (púrpura trombocitopénica idiopática), certos fármacos, alcoolismo e síndrome mielodisplásica (em idosos). Para diferenciar estas condições é importante ter em conta as circunstâncias clínicas, o exame da medula óssea e o resultado de testes sorológicos relevantes. (Bain *et al.*, 2017)

Também é importante referir que uma contagem normal de plaquetas pode ocorrer em distúrbios da função plaquetária. Associados à disfunção plaquetária estão os distúrbios mieloproliferativos/mielodisplásicos e as disproteïnemias. As plaquetas disfuncionais não apresentam obrigatoriamente uma morfologia anormal, embora às vezes sejam maiores do que o normal ou hipogranulares. (Bain *et al.*, 2017)

No esfregaço de sangue periférico, as anomalias plaquetárias mais detetadas são variações do tamanho e a agregação de plaquetas. Por vezes, em colheitas com o anticoagulante EDTA ocorre a aglutinação das plaquetas, o que resulta em pseudotrombocitopenia. (Bain *et al.*, 2017) Nestes casos deve ser solicitada uma nova colheita com o anticoagulante citrato de sódio.

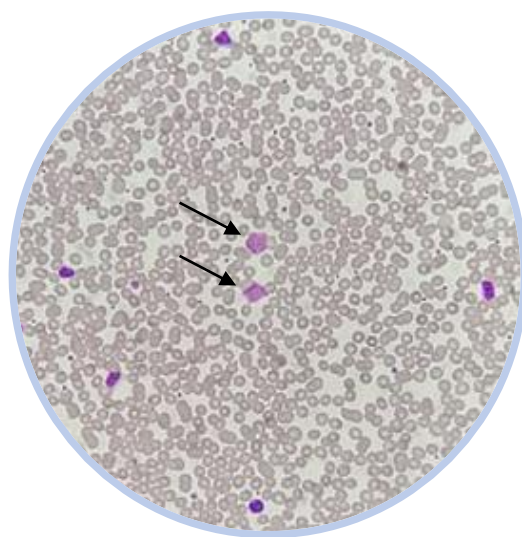


Figura 3 - Sombras Nucleares de Grumpeck (fotografado no LACSL). Neste campo do esfregaço (observado com a objetiva de 40X) estão presentes duas Sombras Nucleares de Grumpeck (indicadas pelas setas). Estes achados correspondem a linfócitos lisados e são encontrados com frequência em utentes com leucemia linfocítica crónica. As manchas arroxeadas são restos do núcleo desses linfócitos.

e. Hemoglobina glicada

A hemoglobina glicada (HbA1c) é um indicador de grande utilidade clínica. A HbA1c resulta de uma reação não enzimática, lenta e irreversível (glicação), entre a glicose que circula no sangue e os grupos amina livres, presentes nas cadeias β da hemoglobina do tipo A. (Sacks *et al.*, 2011) A glicação da hemoglobina sofre variações em função da concentração de glicose a que os eritrócitos são expostos. (Direção-Geral da Saúde, 2012) Assim, a HbA1c numa amostra de sangue reflete a história glicémica ao longo de semanas e meses, atendendo a que o tempo de vida médio dos eritrócitos é de 120 dias. (Goldstein *et al.*, 2004)

No LACSL, a HbA1c é analisada pelo aparelho ADAMS HA 8160 (Arkray) que utiliza o método de cromatografia líquida de alta precisão (HPLC). Assim que a amostra é introduzida no analisador, os eritrócitos são hemolisados e os reagentes de eluição atuam na hemoglobina. As frações de hemoglobina são separadas através de interações eletrostáticas com uma coluna constituída por um material que permite a troca iónica. Os resultados baseiam-se na cor natural da hemoglobina nas frações, medidas a um comprimento de onda de 415 nm, à medida que eluem na coluna. Os resultados são calculados a partir das áreas de pico das diferentes frações de hemoglobina e apresentados como percentagem de HbA1c. (John *et al.*, 1997)

A HbA1c também pode ser expressa em milimoles de HbA1c por mole de hemoglobina (mmol/mol). (Jeppsson *et al.*, 2002) Além disso, a relação entre os níveis de glicose e a concentração de HbA1c permite emitir o resultado como a concentração da glicose média estimada, em miligramas por decilitro (mg/dL). (Sacks *et al.*, 2011)

e.1. Significado clínico da HbA1c

A HbA1c permite avaliar a glicémia média e serve como preditor do risco de desenvolver complicações crónicas da diabetes ou de complicações relacionadas com a gravidez e parto, em mulheres com diabetes prévia à gestação. (Direção-Geral da Saúde, 2012) O termo *diabetes mellitus* descreve uma desordem metabólica que se caracteriza por hiperglicémia crónica e por distúrbios do metabolismo dos hidratos de carbono, relacionados com defeitos na secreção e/ou ação da insulina. (Organização Mundial da Saúde, 2011)

No LACSL, a determinação da HbA1c serve para diagnosticar e monitorizar os utentes com *diabetes mellitus*. O acompanhamento dos utentes diabéticos permite evitar as complicações tardias da doença (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e o risco de hipoglicémia a curto prazo. (Jeppsson *et al.*, 2002) Por outro lado, durante a gravidez, o controlo da concentração de glicose é muito importante para diminuir o risco de malformações congénitas e evitar complicações ao longo da gestação ou durante parto. (Sacks *et al.*, 2011)

f. Velocidade de Sedimentação dos Eritrócitos

A resposta inflamatória à lesão tecidual (resposta de fase aguda) inclui alterações na concentração das proteínas séricas e caracteriza-se, em especial, por uma diminuição da albumina e por aumentos do fibrinogénio, da haptoglobina, da ceruloplasmina, das imunoglobulinas e da proteína c-reativa. A análise da resposta de fase aguda é útil para analisar a presença e extensão de inflamação ou dano tecidual e pode ser determinada pela Velocidade de Sedimentação dos Eritrócitos (VES). (Bain *et al.*, 2017) A VES corresponde à taxa de sedimentação dos eritrócitos no plasma de uma amostra de sangue anticoagulado, durante 60 minutos, em milímetros por hora. (Aytekin, 2018)

No LACSL, a VES é determinada pelo aparelho Ves-Matic Cube 200 (DIESSE), o qual fornece os resultados de acordo com o método de Westergren. No aparelho, as amostras são agitadas para ser obtida uma suspensão homogénea de eritrócitos. Uma primeira leitura, através de um sensor analógico (grupo ótico-eletrónico), determina o nível total de sangue presente no tubo. Durante um período de repouso ocorre a formação de agregados celulares e, de seguida, os tubos iniciam um trajeto de vinte minutos. A velocidade com que os eritrócitos sedimentam no tubo depende do volume/forma dos eritrócitos e das proteínas do plasma. Numa primeira fase, os agregados depositam-se a uma velocidade constante e, à medida que as células se acumulam no fundo do tubo, a taxa de sedimentação diminui. Um segundo sensor realiza uma última leitura, após a sedimentação dos eritrócitos. Um ciclo de análise dura cerca de trinta minutos e o resultado é posteriormente extrapolado para uma hora (mm/hora). (Bain *et al.*, 2017)

f.1. Significado clínico da VES

Os valores da VES variam consoante o sexo e a idade e servem de auxílio no diagnóstico, tratamento e acompanhamento de diversas condições clínicas. (Bain *et al.*, 2017)

Os fatores que aumentam a VES incluem a diminuição do hematócrito e a eventual presença de proteínas plasmáticas (fibrinogénio, imunoglobulinas, etc.) que se ligam à membrana dos eritrócitos, o que facilita o fenómeno de “*rouleaux*” (eritrócitos agregados e empilhados). A VES pode aumentar em condições fisiológicas, como a menstruação, a gravidez e o envelhecimento. (Santos, Cunha e Cunha, 2000)

Resultados da VES dentro dos valores de referência para o sexo e idade não excluem a presença de um estado patológico. A verdade é que várias infeções e doenças estão associadas a valores elevados da VES. (Bain *et al.*, 2017) De entre as condições relacionadas com o aumento da VES destacam-se a hemodiluição (anemias), o aumento de proteínas de

fase aguda (erisipela, doença reumática), a presença de proteínas plasmáticas anormais (mieloma múltiplo), o aumento de imunoglobulinas (processos infecciosos ou inflamatórios) e uma associação destes mecanismos (neoplasias). (Santos, Cunha e Cunha, 2000)

Por outro lado, fatores que reduzem a sedimentação dos eritrócitos incluem o aumento da viscosidade do sangue, a rigidez e alterações morfológicas dos eritrócitos. (Santos, Cunha e Cunha, 2000)

A policitemia, a hipofibrinogenemia e a insuficiência cardíaca congestiva são condições em que a VES se encontra diminuída. (Bain *et al.*, 2017)

g. Coagulação do sangue

Algumas das mais importantes funções do sistema hemostático consistem em manter o sangue no estado líquido enquanto permanece em circulação no sistema vascular, parar a hemorragia através da formação de um tampão hemostático e assegurar a eventual remoção do tampão quando a cicatrização estiver concluída. Os principais componentes envolvidos na hemostasia são as plaquetas, os vasos sanguíneos, o sistema fibrinolítico, bem como os fatores de coagulação do plasma e seus inibidores. (Bain *et al.*, 2017)

A coagulação do sangue envolve um sistema de amplificação em que certas substâncias ativam, por proteólise e de forma sequencial, uma cascata de fatores enzimáticos que termina com a formação de trombina. Pela ação da trombina, o fibrinogênio solúvel do plasma é convertido em fibrina. Nos locais de lesão vascular, a fibrina converte os tampões plaquetários primários em tampões hemostáticos estáveis, firmes e definitivos. (Hoffbrand e Moss, 2011)

g.I. Coagulação *in vivo*

A coagulação *in vivo* (**Figura 4**) inicia-se pela interação do fator tecidual (TF), exposto após lesão vascular, com o fator VII ativo (VIIa). O complexo TF-fator VIIa é responsável pela ativação dos fatores IX e X. Na fase “extrínseca” da coagulação, o fator Xa transforma pequenas quantidades de protrombina em trombina, as quais não são suficientes para iniciar uma polimerização significativa de fibrina. Os fatores VIII e V são ativados pelas pequenas quantidades de trombina formadas na fase de iniciação. A via “intrínseca” é uma fase de amplificação em que o complexo IXa-VIIIa ativa o fator X que, por sua vez, em combinação com o fator Va, fosfolípidos e cálcio, resulta no complexo protrombinase e na formação de trombina. A trombina atua sobre o fibrinogênio e liberta fibrinopeptídeos A e B que originam monômeros de fibrina. A união espontânea dos monômeros de fibrina, através de pontes de

hidrogénio, resulta num polímero de fibrina. O fator XIII, ao ser ativado pela trombina e cálcio, estabiliza os polímeros de fibrina através de ligações covalentes. (Hoffbrand e Moss, 2011)

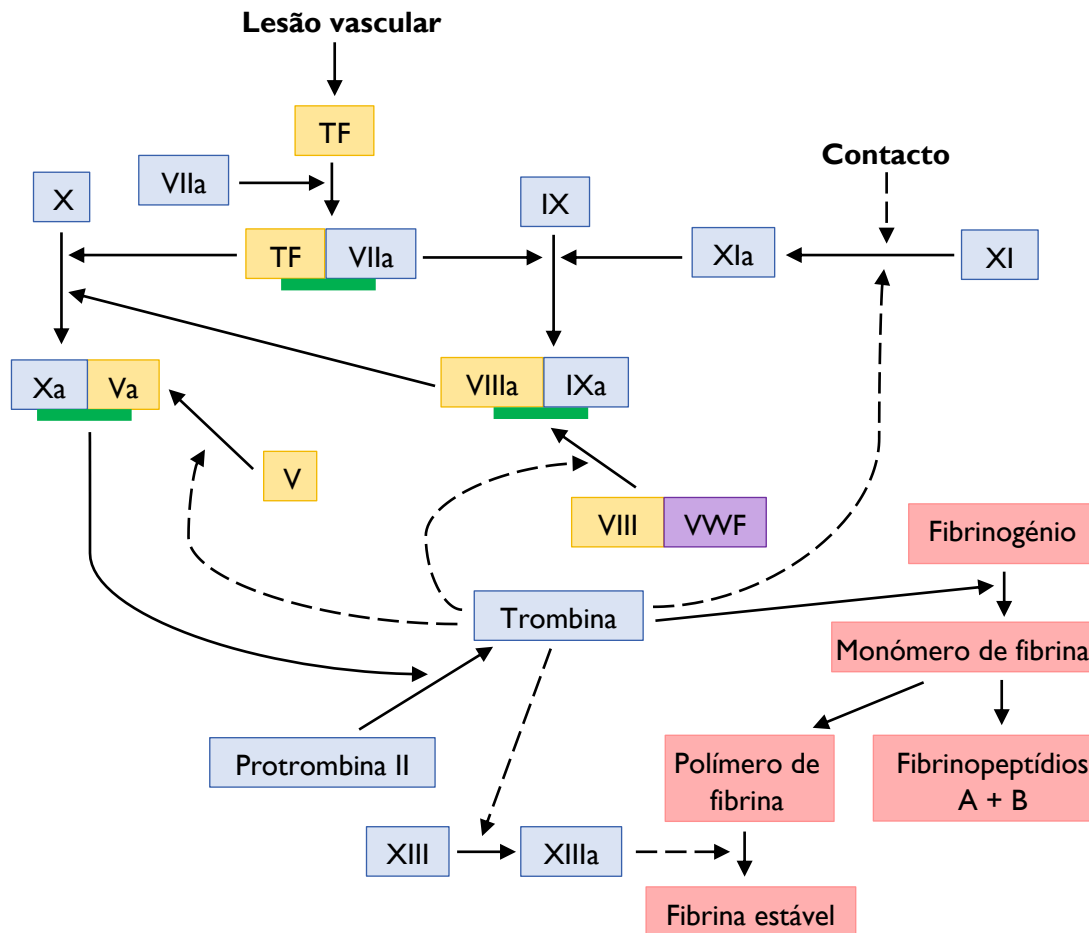


Figura 4 - Cascata de coagulação do sangue. Quando o plasma entra em contacto com o fator tecidual (TF) forma-se o complexo fator VII-FT. Os fatores X e IX são ativados pelo complexo TF-VII ativado (VIIa). O complexo VIIIa-IXa aumenta a ativação do fator X (Xa). A formação de trombina a partir da protrombina, pela ação do complexo Xa-Va, leva à produção de fibrina. A trombina também ativa os fatores V, XI e XIII (linha pontilhada). A separação entre o fator VIII e o fator von Willebrand (VWF), pela trombina (linha pontilhada), resulta num aumento acentuado da formação do complexo VIIIa-IXa e do complexo Xa-Va. A hidrólise do fibrinogénio, pela ação da trombina, resulta na formação de fibrina que origina tampões plaquetários estáveis. *Adaptado de:* Hoffbrand, A. V.; Moss, P. A. H. – *Essential haematology* (2011).

g.2. Tempo de Protrombina e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

Para avaliar a coagulação sanguínea, no LACSL, o Tempo de Protrombina (TP) e o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) são determinados pelo analisador automatizado Sysmex série CA-660 (Siemens). O aparelho determina o tempo de coagulação pelo método de deteção foto-ótica de coágulos. A turvação crescente durante a formação de um coágulo de fibrina é medida como um aumento na intensidade da luz dispersa, quando a amostra é exposta à luz ($\lambda=660$ nm). O TP mede o tempo de coagulação do plasma recalcificado na presença de uma concentração ótima de tromboplastina (extrato de tecido).

O TTPA analisa o tempo de coagulação, após a ativação de fatores de contacto e a adição de fosfolípido e cloreto de cálcio (CaCl_2), mas sem a adição de tromboplastina. Após o início da reação, a luz transmitida é monitorizada até ao final da coagulação (reação de coagulação completa). O tempo de coagulação é determinado num ponto da reação em que a taxa de polimerização do monómero de fibrina é elevada. (Bain *et al.*, 2017)

Através destes testes é possível avaliar a eficácia das vias “extrínseca” (TP) e “intrínseca” (TTPA) da coagulação do sangue. (Bain *et al.*, 2017) O TP avalia os fatores V, VII, X, protrombina e fibrinogénio, enquanto que o TTPA avalia os fatores V, VIII, IX, X, XI, XII, protrombina e fibrinogénio (**Tabela 5**). (Hoffbrand e Moss, 2011)

O resultado do TP pode ser expresso em segundos, percentagem e através da Razão Internacional Normalizada (INR). O INR é calculado através do quociente entre o TP do utente e um TP padrão normal, elevado ao Índice de Sensibilidade Internacional (ISI) do reagente tromboplastina em uso ($\text{INR} = (\text{TP utente} / \text{TP padrão})^{\text{ISI}}$). (Hirsh *et al.*, 2001) O ISI é um valor pré-determinado pelo fabricante e corresponde a 0,99. O TP padrão é de 10,6 segundos e foi estabelecido pelo LACSL, tendo em conta a sua população de utentes.

Os valores do TTPA são expressos em segundos.

g.3. Alongamento do TP e/ou TTPA e o seu significado clínico

A análise do TP e do TTPA são normalmente o primeiro passo na avaliação de utentes que sofrem de hemorragia aguda ou com suspeita de tendência hemorrágica. Estes testes também são determinados como precaução, antes de um procedimento invasivo. (Bain *et al.*, 2017)

O alongamento do TP e/ou TTPA deve-se a deficiências e/ou anomalias nos fatores envolvidos na cascata de coagulação, provocadas por certos distúrbios (**Tabela 5**). (Hoffbrand e Moss, 2011)

g.4. Tratamento com o anticoagulante warfarina

A warfarina é um dos anticoagulantes orais mais utilizados na profilaxia da doença tromboembólica. (Barreira *et al.*, 2004) Este anticoagulante é um antagonista da vitamina K, razão pela qual o tratamento com warfarina resulta na diminuição da atividade biológica dos fatores da coagulação dependentes de vitamina K (II, VII, IX e X). (Hirsh *et al.*, 2001) Apesar da monitorização laboratorial e de uma melhoria na definição dos intervalos terapêuticos, os utentes que fazem terapia anticoagulante com warfarina não estão isentos de complicações hemorrágicas ou tromboembólicas. (Barreira *et al.*, 2004)

No LACSL, vários utentes fazem a monitorização do tratamento com warfarina. As doses de warfarina são ajustadas consoante o INR alvo, estabelecido previamente pelo clínico que efetuou o diagnóstico do distúrbio. Os resultados das provas de coagulação permitem ajustar as doses terapêuticas e regular a periodicidade dos controlos laboratoriais.

Em caso de cirurgias, o controlo do tratamento com warfarina é de extrema importância. Nas cirurgias menores, como extração dentária, a terapêutica pode ser mantida. Porém, em cirurgias mais complexas, a administração de warfarina deve ser interrompida. (Hoffbrand e Moss, 2011)

Tabela 5 - Alongamento do Tempo de Protrombina e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

	Tempo de Protrombina	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada
Anomalias	Inibição ou deficiência de um ou vários dos seguintes fatores de coagulação: V, VII, X, protrombina, fibrinogénio.	Inibição ou deficiência de um ou vários dos seguintes fatores de coagulação: V, VIII, IX, X, XI, XII, protrombina, fibrinogénio.
Causas	Doença hepática, tratamento com warfarina, coagulação intravascular disseminada, deficiência da vitamina K.	Hemofilia (VIII), doença de Christmas (IX, XI, XII), doença hepática, tratamento com warfarina e heparina, coagulação intravascular disseminada, deficiência da vitamina K.

Adaptado de: Hoffbrand, A. V.; Moss, P. A. H. - Essential haematology (2011).

h. Grupos sanguíneos

As primeiras tentativas para transfundir sangue foram infrutíferas porque ocorriam reações que provocavam coagulação intravascular, lesão renal ou até a morte. Hoje em dia sabe-se que as reações às transfusões são causadas por interações entre os antigénios dos eritrócitos e anticorpos presentes no plasma. Para solucionar este problema, os antigénios de superfície dos eritrócitos foram categorizados em grupos sanguíneos. (Seeley, Stephens e Tate, 2005) Nos testes de compatibilidade sanguínea, os sistemas de classificação AB0 e Rh são os mais importantes. (Avent e Reid, 2000)

h.1. Sistema AB0

No sistema AB0 (**Tabela 6**), a classificação dos grupos sanguíneos é realizada pelo tipo de antigénio presente na superfície dos eritrócitos. Neste sentido, o sangue do tipo A tem antigénios do tipo A, o do tipo B tem antigénios do tipo B, o do tipo AB tem ambos os

antigénios e o de tipo 0 não tem antigénios, nem A nem B, à superfície dos eritrócitos. (Seeley, Stephens e Tate, 2005)

Na ausência dos antigénios A ou B são produzidos anticorpos anti-A e anti-B. Uma possível explicação é que bactérias ou alimentos, presentes no tubo digestivo, possuem antigénios do tipo A ou B que estimulam a produção de anticorpos contra os antigénios que são diferentes dos do próprio indivíduo. (Seeley, Stephens e Tate, 2005)

Tabela 6 - Sistema AB0

Grupo/Antigénio	A	B	AB	0
Anticorpos	Anti-B	Anti-A	Ausentes	Anti-A e Anti-B

h.2. Sistema Rh

O sistema Rh é o mais complexo dos grupos sanguíneos e consiste em pelo menos 45 antigénios. Os antigénios Rh mais comuns são os seguintes: D, C ou c e E ou e. O antigénio D é muito imunogénico porque induz uma resposta imune em 80% dos indivíduos Rh-D negativos, em caso de transfusão com sangue Rh-D positivo. Os utentes cujos eritrócitos possuem uma forma alterada da proteína Rh-D (D parcial - D^{vi}) são os mais propensos a produzir anticorpos anti-D. (Avent e Reid, 2000)

No sistema Rh, os anticorpos são produzidos quando um indivíduo Rh-negativo entra em contacto com eritrócitos Rh-positivos. (Seeley, Stephens e Tate, 2005)

h.3. Determinação dos grupos sanguíneos

Os sistemas AB0 e Rh são normalmente testados em conjunto. Para se conhecerem os grupos sanguíneos são efetuados testes do tipo imunohematológico, em que o princípio se baseia na deteção de complexos antigénio-anticorpo. No LACSL, a determinação dos grupos sanguíneos é realizada através de cartas de identificação DiaClon AB0/Rh (Bio-Rad), pela técnica de aglutinação em coluna. Em cada microtubo da carta está presente uma matriz de gel com um anticorpo monoclonal específico. Com a solução ID-Diluent 2 (Bio-Rad) e o sangue total do utente prepara-se uma suspensão de eritrócitos, a qual é adicionada aos microtubos. Durante a centrifugação (centrífuga ID-Centrifuge 6S QiaMed-ID), os eritrócitos livres depositam-se no fundo dos microtubos e os eritrócitos que sofrem aglutinação, pela formação de complexos antigénio-anticorpo, ficam fixados no topo do gel. (Lapierre *et al.*, 1990) Os resultados são de fácil leitura e interpretação, tal como se pode observar na **Figura 5**.

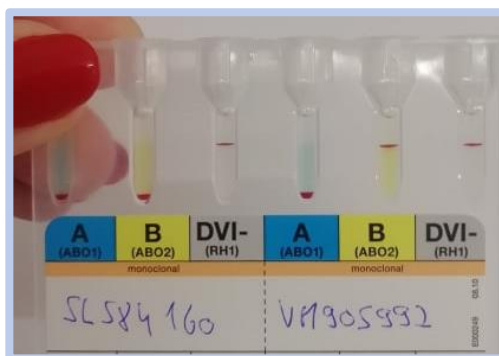


Figura 5 - Carta de identificação DiaClon AB0/Rh (fotografado no LACSL). Anticorpos monoclonais presentes nos microtubos (da esquerda para a direita): 1ª coluna, anticorpos anti-A (grupo A); 2ª coluna, anticorpos anti-B (grupo B); 3ª coluna, anticorpos anti-D (sistema Rh). Em cada microtubo, um pequeno volume de uma suspensão de eritrócitos interage com um tipo específico de anticorpos. A presença de aglutinação indica uma identificação positiva de um tipo de antígeno sanguíneo. A amostra SL584160 (esquerda) é do tipo 0, Rh positivo e a amostra VM905992 (direita) é do tipo B, Rh positivo.

h.4. Importância dos sistemas AB0 e Rh

Os sistemas AB0 e Rh são dos mais importante para efeito das transfusões. (Seeley, Stephens e Tate, 2005)

Na gravidez, a incompatibilidade Rh pode causar problemas fatais quando a grávida é Rh-negativa e o feto é Rh-positivo. A transferência de sangue entre a grávida e o feto, através da placenta, provoca a sensibilização da progenitora. A doença hemolítica do recém-nascido é causada por anticorpos de imunoglobulina G (IgG) maternos que se ligam aos eritrócitos fetais Rh-positivos, o que leva à sua destruição (aglutinação e hemólise) e provoca anemia. (Avent e Reid, 2000)

i. CQI na secção de Hematologia

Na secção de Hematologia são executados diariamente procedimentos de manutenção e controlo dos aparelhos (**Tabela 7**).

As amostras usadas como controlos, além de terem uma concentração e composição conhecidas, podem apresentar dois ou três níveis. Ou seja, um nível considerado normal, cujos resultados dos parâmetros analíticos estão dentro dos valores de referência, definidos para a população geral e saudável; e um ou dois níveis patológicos (baixo e/ou alto) que apresentam valores inferiores ou superiores aos considerados fisiológicos.

Assim, a validação ou ajuste dos aparelhos são assegurados depois da sua lavagem e posterior apreciação dos resultados dos controlos. Após estas rotinas diárias pode iniciar-se o processamento das amostras dos utentes.

Tabela 7 - Rotina de controlo diário dos aparelhos da secção de Hematologia

Aparelhos	Controlo diário
Sysmex XT-4000i	Alternância entre o controlo patológico alto/baixo e o controlo normal
Ves-Matic Cube 200	
ADAMS HA 8160	Ambos os controlos (patológico alto/baixo e normal)
Sysmex CA-660	

j. Caso clínico

Na secção de Hematologia foi recebida uma amostra de sangue, colhida em EDTA, de uma utente com 30 anos. O pedido solicitado foi o hemograma com plaquetas, cujos resultados estão disponíveis na **Tabela 8**.

Tabela 8 - Resultados do hemograma

Parâmetros	Resultados	Valores de referência	Unidades
ERITRÓCITOS	4,5	3,8 - 5,8	10 ¹² /L
Hemoglobina	8,3	11,5 - 16,5	g/dL
Hematócrito	28,3	35,0 - 47,0	%
VCM	63,2	83,0 - 99,0	fL
HCM	18,5	27,0 - 32,0	pg
CHCM	29,3	32,0 - 36,0	g/dL
RDW	19,3	11,0 - 16,0	%
LEUCÓCITOS	8,4	4,0 - 11,0	10 ⁹ /L
Neutrófilos	5,92 (70,2%)	2,1 - 7,6	10 ⁹ /L
Eosinófilos	0,13 (1,5%)	0,0 - 0,4	
Basófilos	0,04 (0,5%)	0,0 - 0,2	
Linfócitos	1,75 (20,7%)	1,0 - 4,2	
Monócitos	0,60 (7,1%)	0,1 - 0,8	
PLAQUETAS	357	150 - 400	10 ⁹ /L

Através da análise dos resultados do hemograma verificou-se que, apesar do número de eritrócitos estar dentro dos valores de referência, a hemoglobina e o hematócrito estavam diminuídos. Os valores do VCM, da HCM e da CHCM também estavam diminuídos em relação aos valores de referência. Um VCM diminuído está associado a microcitose e a redução da CHCM é sugestiva de hipocromia. Por outro lado, o RDW estava aumentado, o que indica

que há variação do tamanho dos eritrócitos (anisocitose). As plaquetas e os leucócitos (e suas subpopulações) apresentaram resultados normais.

Tendo em conta estes resultados foi realizado e observado o esfregaço sanguíneo (**Figura 6**). No esfregaço observou-se microcitose, hipocromia e eritrócitos com diferentes tamanhos e formas (anisocitose e poiquilocitose, respetivamente). Em vários campos estavam presentes células em alvo. Com base nos resultados do hemograma e achados morfológicos, este caso é sugestivo de uma anemia microcítica e hipocrômica por deficiência de ferro. Para confirmar o diagnóstico procedeu-se ao estudo do metabolismo do ferro (**Tabela 9**).



Figura 6 - Esfregaço de sangue periférico (fotografado no LACSL). Neste campo (observado com a objetiva de imersão) estão presentes células com diferentes formas (poiquilocitose) e tamanhos (anisocitose). Além de se observarem células microcíticas e hipocrômicas, também são visíveis células em alvo (indicadas pelas setas).

Tabela 9 - Testes complementares

Parâmetros	Resultados
Ferro sérico	↓
Capacidade total de ligação de ferro	↑
Ferritina	↓
Transferrina	↑

↑ (Aumento em relação aos valores de referência para o sexo e idade), ↓ (Diminuição em relação aos valores de referência para o sexo e idade).

Tendo em conta os resultados do hemograma, as alterações observadas no esfregaço e os resultados dos testes complementares (**Tabela 9**), o diagnóstico final corresponde a anemia por deficiência de ferro.

3.2.2. Microbiologia

Os micróbios apresentam uma distribuição difusa, existem em números astronômicos e muitos deles são prejudiciais, podendo ser a causa de várias doenças no Homem. O contacto do agente patogénico com o hospedeiro está na origem da doença infecciosa, uma interação que é condicionada pelo estado imunológico do utente e pelos fatores de virulência microbiana. Bactérias, vírus, fungos e parasitas são os agentes etiológicos de várias infeções e podem ser exógenos (adquiridos no ambiente, a partir de animais ou de outras pessoas) ou endógenos (microbiota normal do utente). (Baron *et al.*, 1996)

A Microbiologia é a área menos automatizada das Análises Clínicas. Além de identificar os microrganismos que estão na origem das patologias, o seu papel também consiste em analisar a atividade *in vitro* de antibióticos contra esses mesmos agentes patogénicos. (Baron *et al.*, 1996)

As amostras analisadas com mais frequência na secção de Microbiologia do LACSL são a urina, fezes, expetoração, exsudados vaginais/endocervicais e uretrais, exsudados faríngeos/nasais e supurações. Todos os produtos recebidos podem ser infecciosos, pelo que devem ser manipulados de forma apropriada, segundo as boas práticas e técnicas assépticas. O processamento dos vários produtos biológicos compreende a observação macroscópica e microscópica a fresco/após coloração, o exame cultural, a execução de testes de diferenciação/orientação e a identificação/antibiograma pelo analisador automatizado Vitek 2-compact (bioMérieux).

a. Exame direto a fresco e após coloração

O exame microscópico das preparações a fresco e/ou após coloração representa uma importante ferramenta de apoio no processamento das amostras porque permite determinar a sua qualidade, serve de auxílio na interpretação das culturas, semi-quantifica os microrganismos e ajuda a definir testes de diferenciação e orientação suplementares.

Na observação, diferenciação e identificação microbianas, a coloração é um dos procedimentos mais importantes. (Moura *et al.*, 2005) Na rotina do LACSL são realizadas as colorações de Gram e Kinyoun (bacilos ácido-álcool resistentes), após a preparação de esfregaços a partir dos produtos recebidos ou do exame cultural.

O exame direto a fresco e preparações após coloração são observados ao microscópio Nikon Eclipse E4000. Para tal, o campo é focado com a objetiva de 10X e depois procuram-se os microrganismos, células epiteliais e leucócitos com a objetiva de 40X. A confirmação de certas estruturas faz-se com a objetiva de imersão (100X).

a.1. Coloração de Gram

A coloração de Gram (**Anexo V**) diferencia os microrganismos em dois grandes grupos - Gram-positivo e Gram-negativo - de acordo com as diferenças químicas e estruturais das suas paredes celulares. (Madigan *et al.*, 2014)

Quando se aplica um corante básico no esfregaço, como o cristal violeta que confere às células uma coloração roxa, o tratamento com álcool-acetona (diferenciador) descora as células Gram (-), mas não as Gram (+). (Madigan *et al.*, 2014)

A parede celular das bactérias Gram (+) é constituída por uma espessa camada de peptidoglicano com vários polissacarídeos. O ácido teicoico e o ácido lipoteicoico (polissacarídeos) formam-se a partir de açúcares carregados negativamente e conferem uma carga global negativa à superfície da célula Gram (+). Pelo contrário, as bactérias Gram (-) apresentam uma camada de peptidoglicano menos densa, revestida por uma bicamada lipídica (membrana externa). A camada externa da membrana lipídica inclui lipopolissacarídeos carregados negativamente, pelo que as bactérias Gram (-) têm uma carga global negativa à superfície celular. Portanto, as células Gram (+) e Gram (-) têm uma superfície celular com carga global negativa e interação com os corantes básicos (catiônicos) cristal violeta e safranina. (Bartholomew e Mittwer, 1952; Moyes, Reynolds, Breakwell, 2009)

O iodo, presente na solução de lugol, atua nos dois tipos de células e forma um precipitado com o cristal violeta. (Bartholomew e Mittwer, 1952; Moyes, Reynolds e Breakwell, 2009)

Nas células Gram (+), o efeito do diferenciador é reduzido porque o complexo cristal violeta-iodo produz cristais de corante que ficam aprisionados na matriz da parede celular. Após o período de descoloração, grande parte do precipitado é retido e as células adquirem uma coloração roxa a violeta. Nas células Gram (-), o diferenciador álcool-acetona dissocia os lípidos da membrana externa e diminui a integridade da parede celular, de modo que o precipitado é removido e as células ficam incolores. Quando se aplica a safranina (corante de contraste), os microrganismos Gram (-) adquirem uma coloração cor-de-rosa. (Bartholomew e Mittwer, 1952; Moyes, Reynolds, Breakwell, 2009)

Após a coloração de Gram, os microrganismos podem ser distinguidos através das suas cores/formas e classificados em cocos Gram(-), cocos Gram (+), bacilos Gram (-) e bacilos Gram (+). (Moyes, Reynolds e Breakwell, 2009) Além disso, esta coloração também permite observar os fungos e leveduras.

a.2. Coloração de Kinyoun

A coloração de Kinyoun (**Anexo VI**) permite observar e identificar Bacilos Ácido-Álcool Resistentes (BAAR).

A parede celular das micobactérias é um complexo tripartido (membrana externa, polissacarídeos arabinogalactanos e peptidoglicano) e contém até 60% de lípidos. Nos lípidos estão incluídos os ácidos gordos de cadeia longa, designados por ácidos micólicos, presentes na membrana externa. Os ácidos micólicos ligam-se aos arabinogalactanos que, por sua vez, se ligam ao peptidoglicano. Nas técnicas de coloração, o elevado teor em ácidos micólicos da parede celular torna as micobactérias resistentes à descoloração com soluções de ácido-álcool. (Chiaradia *et al.*, 2017; Forbes *et al.*, 2018)

No método de Kinyoun, a solução de carbolfucsina é constituída por fucsina básica (corante catiónico) e fenol (agente lipofílico). Os ácidos micólicos e os restantes lípidos da parede celular funcionam como uma barreira protetora e impedem a entrada da fucsina básica. O fenol ao aumentar a lipofilia (afinidade para os lípidos) ajuda o corante a passar através da parede lipídica e permite a sua ligação aos aniões presentes na estrutura bacteriana. (Vasanthakumari, Jagannath e Rajasekaran, 1986; Ellis e Zabrowarny, 1993)

A descoloração com uma solução de ácido sulfúrico e álcool etílico remove o corante de todas as estruturas, com exceção dos BAAR. Os BAAR retêm a fucsina básica e coram de vermelho. O azul de metileno (corante de contraste) confere uma coloração azul aos restantes microrganismos e estruturas. Portanto, com este método, os BAAR aparecem corados de vermelho sobre um fundo azul. (Vasanthakumari, Jagannath e Rajasekaran, 1986; Ellis e Zabrowarny, 1993; Moura *et al.*, 2005)

b. Exame cultural

Na **Tabela 10** são referidos os meios de cultura utilizados no LACSL.

Os meios são semeados com recurso a uma ansa pela técnica de esgotamento do produto, em que uma pequena porção da amostra (inóculo) é aplicada num quadrante e, a partir desse ponto, estrias apertadas são realizadas. Através desta técnica, um número decrescente de microrganismos é depositado de forma a facilitar o seu isolamento.

A interpretação dos resultados do exame cultural deve ser realizada consoante o historial clínico do utente, a origem anatómica das amostras, as observações macroscópicas e microscópicas e os resultados de testes de diferenciação e orientação.

Tabela 10 - Meios de cultura disponíveis no LACSL

Meio (bioMérieux)	Tipo	Aplicação	Referências
CLED	Não seletivo	Isolamento de microrganismos do trato urinário	Benner, 1970
SS (<i>Salmonella Shigella</i>)	Seletivo	Identificação de <i>Salmonella</i> sp. e <i>Shigella</i> sp.	Isenberg, Kominos e Siegel, 1969
Hektoen	Seletivo	Identificação de <i>Salmonella</i> sp. e <i>Shigella</i> sp.	King e Metzger, 1968
Selenito	Enriquecimento	Recuperação de <i>Salmonella</i> sp. e <i>Shigella</i> sp.	Zimbro <i>et al.</i> , 2009
COS (gelose de sangue)	Não seletivo	Isolamento de microrganismos fastidiosos e não fastidiosos	Zimbro <i>et al.</i> , 2009
Chocolate PolyViteX	Não seletivo e enriquecido	Isolamento de microrganismos exigentes (em especial <i>Neisseria</i> sp. e <i>Haemophilus</i> sp.)	Zimbro <i>et al.</i> , 2009
MacConkey	Seletivo	Isolamento de várias bactérias Gram (-)	Pompeie <i>et al.</i> , 1996
Chapman	Seletivo	Isolamento de estafilococos	Chapman, 1945
Löwenstein-Jensen	Seletivo	Isolamento de bactérias do género <i>Mycobacterium</i>	Zimbro <i>et al.</i> , 2009
Sabouraud	Seletivo	Isolamento de leveduras e bolores	Brun <i>et al.</i> , 2001
Granada	Seletivo	Deteção de <i>Streptococcus agalactiae</i>	Zimbro <i>et al.</i> , 2009

CLED (Cistina Lactose Deficiente em Eletrólitos), **COS** (Gelose Columbia enriquecida com 5% de sangue de carneiro).

c. Condições de incubação no LACSL

No LACSL, a estufa de incubação (Heraeus Instruments) apresenta uma atmosfera aeróbia e uma temperatura de aproximadamente 37°C.

Como o aumento do teor em dióxido de carbono (CO₂) é benéfico para o desenvolvimento de determinadas bactérias, a produção de uma atmosfera mais rica em CO₂ é assegurada pelo método da jarra com vela. Neste método, as placas de cultura são introduzidas numa jarra de dessecação e uma vela é acendida no seu interior para se consumir parte do oxigénio. Quando a chama se apaga é obtida uma atmosfera com 3 a 10% de CO₂. (Baron *et al.*, 1996)

d. Colheita e processamento das amostras biológicas

d.1. Urina

As infeções do aparelho urinário estão entre as infeções bacterianas mais comuns. (Flores-Mireles *et al.*, 2015) A urina é um líquido estéril, mas as bactérias que colonizam a

uretra podem ser arrastadas durante a micção. Caso isto aconteça podem ocorrer erros na interpretação da urocultura. (Fonseca *et al.*, 2004)

Estas infecções caracterizam-se por hematúria, disúria e na maioria dos casos são provocadas por bactérias da microbiota intestinal saprófita que invadem o aparelho urinário. (Foxman, 2014) Os agentes etiológicos mais frequentes pertencem à família *Enterobacteriaceae* e a *Escherichia coli* é responsável por mais de 80% de todas as infecções adquiridas na comunidade. (McLellan e Hunstad, 2016) No entanto, em utentes algaliados de forma permanente, com cálculos urinários ou outras patologias do trato urinário, as infecções podem ser provocadas por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Enterococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, e fungos. (Fonseca *et al.*, 2004)

d.1.1. Colheita

Para o exame bacteriológico, uma amostra de urina pode ser colhida de várias formas (punção de cateter urinário, punção suprapúbica ou através de saco coletor em crianças). O ideal é colher o segundo jato da primeira urina da manhã, depois de uma lavagem cuidadosa da genitália externa para evitar contaminações com a microbiota normal. (Fonseca *et al.*, 2004)

d.1.2. Processamento

d.1.2.1. Análise sumária de urina

A análise sumária de urina é realizada sempre que uma amostra de urina é recebida no laboratório para exame bacteriológico. Esta análise compreende a avaliação semiquantitativa de certos parâmetros bioquímicos e a observação do sedimento urinário. Uma porção da amostra de urina é colocada num tubo apropriado e analisada pelos aparelhos Clinitek Novus™ (Siemens) e UF-1000i (Sysmex).

No analisador Clinitek Novus™ existem tiras impregnadas com reagentes (tiras de Combur) que detetam a presença ou ausência dos analitos através de reações químicas rápidas (**Tabela II**). O sistema ótico do aparelho analisa o aspeto macroscópico da amostra (cor e turvação), bem como a cor e a intensidade da luz refletida pelas placas de teste onde ocorreu reação. O analisador UF-1000i utiliza a citometria de fluxo para realizar a contagem de células epiteliais, eritrócitos, leucócitos, cilindros, bactérias e para produzir outras informações (**Tabela II**).

Quando os resultados dos dois aparelhos são incompatíveis, o sedimento urinário é observado ao microscópio ótico, após centrifugação da amostra a 1500 r.p.m. durante 10 minutos. Durante a análise devem ser observados pelo menos 10 campos diferentes, com a

objetiva de 40X, e pesquisados elementos celulares como eritrócitos, leucócitos, células epiteliais, fungos ou parasitas.

Tabela 11 – Clinitek Novus™ e UF-1000i

	Clinitek Novus™	UF-1000i
Parâmetros	Albumina, bilirrubina, urobilinogênio, sangue (oculto), creatinina, glicose, corpos cetônicos, leucócitos, nitritos, proteínas, densidade, pH	Eritrócitos, leucócitos, células epiteliais, cilindros, bactérias
Outras informações	Cor e turvação	Cristais, leveduras, muco, espermatozoides, condutividade

d.1.2.2. Urocultura

A urocultura permite quantificar os microrganismos presentes na urina, através da sua inoculação em gelose CLED, com recurso a uma ansa calibrada de 1 µL. Após a realização da sementeira, a placa é incubada durante 18 a 24 horas, a 37°C.

A gelose CLED (Cistina Lactose Deficiente em Eletrólitos) é um meio não seletivo recomendado para o isolamento e identificação presuntiva de microrganismos do trato urinário. (Benner, 1970) A sua reduzida concentração em eletrólitos reduz a formação de “swarming” de *Proteus* spp. (Jones e Park, 1967) A L-cistina é um suplemento que potencia o crescimento de coliformes, o azul de bromotimol é o indicador de pH e a lactose é o açúcar que permite diferenciar as bactérias fermentadoras e não fermentadoras. (Zimbro *et al.*, 2009)

As bactérias positivas para a fermentação da lactose produzem colónias amarelas, através da acidificação do meio, e as bactérias não fermentadoras produzem colónias verdes, azuis ou incolores. (Sandys, 1960)

Escherichia coli e bactérias do género *Klebsiella* correspondem aos microrganismos isolados com maior frequência nas amostras de urina recebidas no LACSL. Normalmente as colónias de *Escherichia coli* são amarelas e opacas e as colónias do género *Klebsiella* são amarelas a azul esbranquiçado e mucoides (**Figura 7**).

A quantificação do crescimento microbiano, em Unidades Formadoras de Colónias por mililitro de urina (UFC/mL), é feita por comparação do crescimento em gelose CLED com cartas padrão da bioMérieux. Uma urocultura é positiva se existirem pelo menos 10⁵ UFC/mL (**Tabela 12**).

Quando positiva, a urocultura continua em análise para a identificação do agente patogénico e respetivo antibiograma. Porém, se forem observadas colónias de diferentes

estirpes bacterianas (duas ou mais) considera-se que a cultura é polimicrobiana e que a amostra foi contaminada, devido a uma má técnica de colheita ou a um atraso no transporte e/ou no processamento laboratorial da mesma.

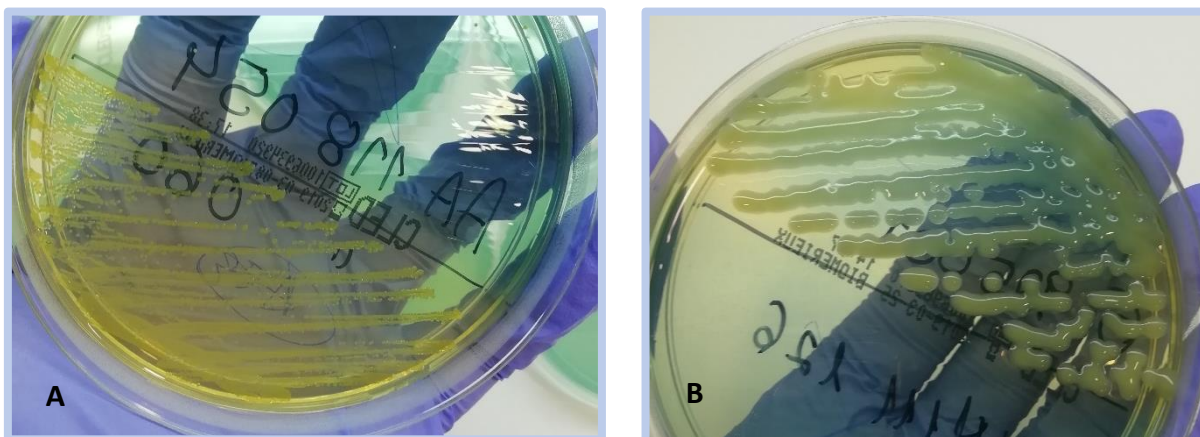


Figura 7 - Colônias de *Escherichia coli* (A) e de bactérias do gênero *Klebsiella* (B), isoladas em gelose CLED (fotografado no LACSL). A - Colônias de *Escherichia coli* amarelas e opacas; B - Colônias do gênero *Klebsiella* amarelas a azul esverdeado e extremamente mucoides.

Tabela 12 – Interpretação do crescimento microbiano na gelose CLED

Isolado	Densidade (UFC/mL)	Indicações
Único	< 10 ⁴	Contaminação uretral ou vaginal
	10 ⁴ a 10 ⁵	Avaliação com base na informação clínica
	> 10 ⁵	Infeção

UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônias por mililitro).

Por fim, uma cultura de urina em gelose de sangue só é efetuada se for solicitada a pesquisa de bactérias de crescimento fastidioso ou se os resultados da citometria de fluxo e/ou exame microscópico do sedimento apresentarem alguma discrepância com o exame cultural. Caso seja pedido exame micológico, a amostra de urina é semeada em meio Sabouraud com gentamicina e cloranfenicol.

d.2. Fezes

O aparelho gastrointestinal humano apresenta uma dinâmica e complexa população de microrganismos que exerce uma grande influência no hospedeiro durante a homeostase e a doença. (Thursby e Juge, 2017)

As infeções gastrointestinais afetam a população em geral, mas têm uma elevada morbidade em crianças e idosos. A pesquisa dos agentes etiológicos deve ser orientada tendo em conta os antecedentes epidemiológicos, fatores predisponentes, a presença de sinais e sintomas clínicos e o tipo de diarreia. (Fonseca *et al.*, 2004)

d.2.1. Colheita

As amostras de fezes devem ser colhidas de preferência na fase aguda da doença intestinal (três primeiros dias). Para uma colheita adequada devem evitar-se contaminações com urina ou outras secreções e escolher-se de preferência as porções com sangue, muco ou pus (porções com um elevado número de microrganismos). (Moura *et al.*, 2005)

Para o exame parasitológico, o utente deve colher três amostras em dias sucessivos (de preferência em dias alternados) e evitar antidiarreicos, supositórios ou laxantes oleosos. (Fonseca *et al.*, 2004)

d.2.2. Processamento

d.2.2.1. Pesquisa de *Salmonella* sp. e *Shigella* sp. (Coprocultura)

Nos países desenvolvidos, a gastroenterite aguda e a enterocolite são as formas mais comuns de infeção por *Salmonella* sp., em particular *Salmonella enterica* subespécie *enterica*. (Dekker e Frank, 2015)

A shigelose é muito infecciosa e todas as quatro espécies de *Shigella* podem provocar manifestações intestinais graves. No entanto, as mais comuns são causadas pela *Shigella dysenteriae* tipo I, em parte devido à produção de toxina Shiga. (Dekker e Frank, 2015)

A pesquisa de *Salmonella* sp. e *Shigella* sp. é efetuada em simultâneo. Assim que as amostras fecais chegam ao laboratório são cultivadas em gelose SS, Hektoen e em caldo Selenito. A incubação dos meios é feita a 37°C, durante 18 a 24 horas. Após este período de crescimento e enriquecimento, o caldo Selenito é semeado em gelose *Salmonella Shigella* (SS) e Hektoen.

A gelose SS é um meio seletivo para as espécies de *Salmonella* e *Shigella* presentes em amostras de fezes. (Isenberg, Kominos e Siegel, 1969) Os sais biliares inibem a microbiota intestinal e o indicador de pH é o vermelho neutro. A lactose é o açúcar que permite diferenciar os microrganismos fermentadores dos não fermentadores. A produção de sulfureto de hidrogénio (H₂S) é detetada através do tiosulfato de sódio e do citrato férrico amoniacal. Se uma bactéria possuir a enzima tiosulfato redutase, o substrato tiosulfato de sódio é utilizado e há libertação de sulfureto. A reação do sulfureto com iões de hidrogénio

leva à formação de H_2S , um gás que reage com os íons férricos do citrato férrico amoniacal. Desta interação surge o sulfureto ferroso, com a consequente formação de um precipitado de cor negra. (Zimbro et al., 2009)

O indicador de pH deteta a produção de ácido pelos microrganismos que fermentam a lactose, o que resulta na formação de colónias cor-de-rosa ou vermelhas. Porém, a maioria dos patógenos intestinais não fermentam a lactose e formam colónias incolores. Assim, colónias incolores ou ligeiramente coloridas, com ou sem um centro preto, são sugestivas de *Salmonella* sp. ou *Shigella* sp. Isto porque as colónias de *Salmonella* são incolores com ou sem centro negro (H_2S positivas) e as colónias de *Shigella* são incolores sem centro preto (H_2S negativas). (Zimbro et al., 2009)

A gelose Hektoen é um meio seletivo para isolamento de *Salmonella* sp. e *Shigella* sp. (King e Metzger, 1968) O citrato de amónio férrico e o tiosulfato de sódio estão presentes na gelose e os açúcares disponíveis são a lactose, sacarose e salicina. A concentração da lactose é maior do que em muitos outros meios, a fim de minimizar o problema da fermentação tardia e facilitar a visualização microbiana. A inibição de bactérias Gram (+) é garantida pelos sais biliares e o sistema indicador de pH consiste no azul de bromotimol e fucsina ácida. (Zimbro et al., 2009)

As bactérias que fermentam um dos três açúcares formam colónias amarelas ou rosa amarelado. Os microrganismos não fermentadores produzem colónias de cor verde a verde azulado. (Zimbro et al., 2009) Portanto, no meio Hektoen, as colónias de *Salmonella* sp. ou *Shigella* sp. são verdes ou azuis, com ou sem um centro negro. (Dekker e Frank, 2015)

O caldo Selenito é um meio líquido de enriquecimento que exibe efeitos inibidores e diferenciais. (Stokes e Osborne, 1955) O selenito de sódio disponível no caldo inibe coliformes e outras espécies microbianas, permitindo recuperar bactérias de *Salmonella* sp. e *Shigella* sp. Quando o selenito é reduzido pelo crescimento bacteriano, o pH aumenta e o meio fica alcalino. Um meio alcalino diminui a toxicidade do selenito e leva ao crescimento excessivo de bactérias sem interesse clínico. Portanto, o ácido produzido pela fermentação da lactose serve para manter um pH neutro ou ligeiramente diminuído. (Zimbro et al., 2009)

A identificação e antibiograma dos microrganismos isolados realizam-se quando a coprocultura é positiva.

As culturas de fezes em gelose de Chapman e Sabouraud com gentamicina e cloranfenicol só são efetuadas quando solicitado pelo clínico.

d.2.2.2. Pesquisa de *Campylobacter* spp.

Hoje em dia, as espécies de *Campylobacter* (*Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* principalmente) são uma das causas bacterianas mais comuns de diarreia, tanto em adultos quanto em pacientes pediátricos. (Facciola, 2017)

No LACSL, a pesquisa de *Campylobacter* spp. efetua-se através do ensaio imunocromatográfico CerTest Biotec *Campylobacter* (CerTest Biotec). Nesta pesquisa procede-se à incubação de uma parte da amostra (fezes diluídas em solução tampão) numa cassette de teste, à temperatura ambiente. Decorridos dez minutos, a leitura e interpretação do resultado são realizadas.

Na cassette de teste está presente uma membrana de nitrocelulose impregnada na zona de teste com anticorpos monoclonais de camundongo contra *Campylobacter* e na região controlo com anticorpos policlonais IgG de coelho contra uma proteína específica. A cassette também é constituída por anticorpos anti-*Campylobacter* conjugados a micropartículas de poliestireno vermelhas, bem como por proteínas de ligação específicas conjugadas com microesferas de poliestireno verdes. Numa pesquisa positiva, os antigénios da amostra de fezes diluída reagem com os anticorpos anti-*Campylobacter* e o complexo formado migra ao longo da membrana, pela ação da capilaridade. Os anticorpos anti-*Campylobacter* pré-revestidos na região de teste capturam o complexo e forma-se uma linha vermelha de intensidade variável. Na membrana, a mistura migra até à região controlo, onde se encontram imobilizados anticorpos específicos. Quando estes anticorpos reconhecem a proteína de ligação específica forma-se a linha controlo verde, a qual serve como controlo interno dos reagentes, para verificar se um volume suficiente de amostra foi adicionado e se foi obtida uma migração adequada. (Kawatsu *et al.*, 2008) Portanto, apenas se considera a pesquisa positiva e válida se também surgir a linha da região controlo.

d.2.2.3. Pesquisa de *Helicobacter pylori*

A bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) pode estar presente em mais de metade da população mundial e as características clínicas das suas infeções variam de gastrite assintomática a malignidade gastrointestinal. (Diaconu *et al.*, 2017)

No LACSL, a pesquisa de *H. pylori* é realizada quando requisitada pelo clínico, através do teste imunocromatográfico bioNexia® *H. pylori* Ag (bioMérieux). Para tal, uma porção da amostra (fezes diluídas em solução tampão) é incubada numa cassette de teste, à temperatura ambiente. Após dez minutos, o resultado da pesquisa deve ser lido e interpretado.

Na cassette de teste estão presentes anticorpos de camundongo anti-*H. pylori* conjugados com partículas de látex vermelhas e proteínas de ligação específicas conjugadas a microesferas de poliestireno verdes. Na região de teste está imobilizado um anticorpo monoclonal anti-*H. pylori* e na região controlo encontram-se anticorpos policlonais de cabra IgG contra uma proteína específica. Na amostra de fezes, se existir o antígeno de *H. pylori* ocorre a sua conjugação com o anticorpo monoclonal anti-*H. pylori*. O complexo formado migra por capilaridade ao longo da membrana e é capturado na linha de teste pelo anticorpo anti-*H. pylori*, formando-se uma linha vermelha de intensidade variável. Na zona controlo, a ligação das proteínas de ligação específicas aos anticorpos que as reconhecem traduz-se pela formação da linha verde controlo. (Briand *et al.*, 2015) Com o aparecimento da linha controlo considera-se a pesquisa positiva e válida.

d.2.2.4. Pesquisa de Rota e Adenovírus

A maioria das diarreias infantis são provocadas por vírus. (Bicer *et al.*, 2011) Na verdade, os rotavírus são considerados o principal agente etiológico da diarreia aguda em crianças e o adenovírus é o segundo ofensor mais comum. (Ribeiro *et al.*, 2013)

A pesquisa de Rota e Adenovírus também só é efetuada quando solicitada. O teste imunocromatográfico bioNexia[®] Rota-Adeno (bioMérieux) permite detetar e diferenciar Rota e Adenovírus em amostras fecais de utentes com sintomatologia de gastroenterite. Nesta pesquisa, parte da amostra de fezes é diluída numa solução tampão e incubada durante dez minutos à temperatura ambiente. Após dez minutos, os resultados são lidos e registados.

A membrana da cassette está impregnada com microesferas de poliestireno azuis sensibilizadas com anticorpos monoclonais de camundongo anti-Rotavírus, assim como microesferas de cor vermelha marcadas com anticorpos monoclonais de camundongo anti-Adenovírus. Na cassette existem duas regiões de teste, uma impregnada com anticorpo monoclonal de camundongo anti-Rotavírus e outra com anticorpo monoclonal de camundongo anti-Adenovírus. A região controlo encontra-se pré-revestida com anticorpo de ovelha anti-camundongo. Se a amostra contiver antígeno de Rotavírus, este liga-se ao anticorpo anti-Rotavírus. Do mesmo modo, se estiver presente antígeno de Adenovírus ocorre a sua ligação ao anticorpo anti-Adenovírus. Os complexos formados migram na membrana da cassette e são detetados nas zonas de teste - linha azul para o Rotavírus e linha vermelha para o Adenovírus. O resultado da análise é positivo quando surge uma linha, numa ou em ambas as zonas de teste, mas a pesquisa só é válida se também aparecer a linha controlo. A linha controlo é o resultado da reação entre o anticorpo de ovelha anti-camundongo e os

anticorpos anti-Rotavírus e anti-Adenovírus conjugados com microesferas de poliestireno. (Kim *et al.*, 2014)

d.2.2.5. Exame parasitológico

A incidência de parasitoses intestinais em Portugal tem vindo a diminuir, devido à melhoria das condições higieno-sanitárias. (Fernandes *et al.*, 2012) Ainda assim, os protozoários e helmintas podem estar na origem de infeções gastrointestinais. Nos países desenvolvidos, *Giardia intestinalis* é a causa parasitária de diarreia mais frequente. (Haque, 2007) Em Portugal, a taxa de parasitismo intestinal deve-se sobretudo a infeções por *Giardia lamblia* e alguns helmintas, dos quais *Trichuris trichiura* parece ser o mais prevalente. (Fernandes *et al.*, 2012)

No LACSL, o exame parasitológico consiste numa preparação a fresco, em que se realiza uma suspensão de fezes em soro fisiológico (método de concentração simples). A suspensão preparada é incubada à temperatura ambiente, durante pelo menos duas horas. A sedimentação da preparação ocorre durante este período de incubação e os parasitas concentram-se no sedimento formado pela ação da gravidade. O sedimento é observado ao microscópio entre lâmina e lamela. Com a objetiva de pequena ampliação (10X) foca-se o campo e, através da objetiva de maior ampliação (40X), procuram-se características morfológicas e estruturas dos parasitas intestinais - trofozoítos/quistos dos protozoários e ovos/larvas dos helmintas. A observação de estruturas parasitárias permite estabelecer um diagnóstico definitivo.

d.3. Expetoração

No LACSL, a expetoração é a amostra recebida com mais frequência para o diagnóstico das infeções do trato respiratório inferior.

Apesar dos avanços diagnóstico-terapêuticos, as pneumonias são ainda a causa mais relevante de morte atribuída à doença infecciosa, sendo o *Streptococcus pneumoniae* o principal agente etiológico. (Levy, 2004)

Na orofaringe de indivíduos saudáveis, diversos agentes patogénicos como *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, leveduras e enterobactérias, podem estar presente em pequeno número ou representar uma microbiota transitória. (Levy, 2004) Neste sentido, quando uma expetoração é contaminada com a microbiota comensal da orofaringe, a sua análise é dificultada.

d.3.1. Colheita

A expetoração para cultura deve ser colhida de preferência de manhã cedo, em jejum, através de tosse profunda (expetoração tráqueo-bronquial). (Fonseca *et al.*, 2004)

d.3.2. Processamento

d.3.2.1. Avaliação da qualidade de amostras de expetoração

Quando existe uma forte suspeita de infecção por bactérias comuns efetua-se um exame direto, após coloração de Gram. Nesta análise deve ter-se em atenção a relação entre os leucócitos e células epiteliais, bem como a abundância e características morfológicas dos microrganismos observados.

Assim, pelo menos dez campos devem ser analisados com a objetiva de 10X. Este procedimento serve para identificar uma verdadeira expetoração e para perceber quando as amostras estão contaminadas com saliva, tendo em consideração os critérios de Murray e Washington (**Tabela 13**). As verdadeiras expetorações pertencem aos grupos 4 e 5 da classificação de Murray e Washington. Quando as amostras se inserem nos restantes grupos, os microrganismos isolados em cultura não são valorizados porque se considera que durante a colheita ocorreu contaminação com as secreções da orofaringe. (Fonseca *et al.*, 2004)

Por outro lado, com a objetiva de imersão (100X) avalia-se o predomínio microbiano, tendo em conta a morfologia cocóide/bacilar e se correspondem a bactérias Gram (+) ou Gram (-). Se for observado algum microrganismo em abundância, esse será considerado o agente infeccioso. Caso estejam presentes diferentes microrganismos, a amostra é polimicrobiana e o exame cultural não será valorizado.

Tabela 13 - Critérios de Murray e Washington

	Células epiteliais/campo	Leucócitos/campo
Grupo 1	25	10
Grupo 2	25	10 - 25
Grupo 3	25	25
Grupo 4	10 - 25	25
Grupo 5	<10	25

Retirado de: Fonseca *et al.* - Orientações para a elaboração de um Manual de Boas Práticas em Bacteriologia (2004).

Além da análise microscópica, a amostra de expetoração é cultivada em gelose de sangue, gelose de chocolate, MacConkey e Chapman. A incubação das geloses de sangue e

chocolate é feita a 37°C, durante 18 a 48 horas, numa atmosfera com 3 a 10% de CO₂. Os meios MacConkey e Chapman são incubados por 18 a 24 horas, a 37°C.

A gelose Columbia enriquecida com 5% de sangue de carneiro (gelose de sangue - COS) é um meio não seletivo e de uso geral para o isolamento de microrganismos fastidiosos e não fastidiosos. Para suportar o crescimento de bactérias exigentes, as propriedades do meio são reforçadas por uma combinação de peptonas que fornecem nitrogénio, carbono, vitaminas e nutrientes essenciais. (Zimbro *et al.*, 2009) A adição de sangue torna o meio mais nutritivo, fornece o fator X (hemina) e permite detetar a formação de halos de hemólise. (Facklam *et al.*, 1979) A incorporação de amido favorece o desenvolvimento de microrganismos do género *Neisseria*. (Ellner *et al.*, 1966)

A formação de halos de hemólise é um critério básico que serve de orientação na identificação bacteriana. Por este motivo, a eventual presença de halos de α -hemólise (coloração esverdeada em torno da colónia) e β -hemólise (zona clara à volta ou por baixo da colónia) deve ser valorizada. (Zimbro *et al.*, 2009)

A gelose de chocolate PolyViteX é um meio não seletivo particularmente recomendado para o crescimento de estirpes exigentes, em especial bactérias dos géneros *Neisseria* e *Haemophilus*. Nesta gelose, os eritrócitos lisados por aquecimento conferem a cor castanha característica do meio. A base nutritiva do meio é enriquecida pelos fatores X (hemina) e V (dinucleótido de nicotinamida adenina - NAD), fornecidos pela hemoglobina dos eritrócitos lisados e pelo PolyViteX™, respetivamente. (Zimbro *et al.*, 2009) O PolyViteX™ é um suplemento que consiste numa mistura de vitaminas, cofatores e outros nutrientes, desenvolvido para auxiliar o desenvolvimento de organismos fastidiosos. (Lorian, 2005) Assim, bactérias que requerem ambos os fatores (V e X), como *Haemophilus influenzae*, crescem neste meio. (Zimbro *et al.*, 2009)

A gelose MacConkey é um meio seletivo usado para o isolamento de enterobactérias e várias bactérias Gram (-). (Pompei *et al.*, 1996) Os sais biliares e o cristal violeta asseguram a seletividade do meio para as bactérias Gram (-), através da inibição das bactérias Gram (+). A lactose é o açúcar disponível no meio e a sua fermentação é detetada pela alteração de cor do indicador de pH vermelho neutro. (Zimbro *et al.*, 2009)

Neste meio, os microrganismos fermentadores da lactose produzem colónias cor-de-rosa a vermelho, por vezes rodeadas por um halo de sais biliares precipitados. Isto acontece porque a diminuição do pH, em virtude da fermentação da lactose, além de produzir uma mudança na cor do indicador de pH, também pode levar à formação de um precipitado de

bílis em torno da colónia. Os microrganismos que não fermentam a lactose produzem colónias incolores ou ligeiramente beges. (Rollender *et al.*, 1968)

A gelose de Chapman é um meio que se destina ao isolamento seletivo de estafilococos. O elevado teor em cloreto de sódio (NaCl) limita o desenvolvimento de bactérias que não as do género *Staphylococcus*. Neste sentido, o NaCl atua como um agente seletivo porque a maioria das espécies bacterianas é inibida pela elevada concentração de sal. (Chapman, 1945) Além de NaCl, esta gelose contém o açúcar manitol, o indicador de pH vermelho de fenol e peptonas essenciais ao crescimento bacteriano. (Zimbro *et al.*, 2009)

Os microrganismos que fermentam o manitol provocam uma mudança na cor do indicador de pH e formam colónias amarelas, característica que serve de orientação para a identificação de *Staphylococcus aureus*. Porém, como a fermentação do manitol não é específica de *Staphylococcus aureus*, além dos estafilococos, outros microrganismos podem desenvolver-se no meio. (Zimbro *et al.*, 2009) Por esta razão, a inoculação da amostra em meios não seletivos e a realização de testes complementares são recomendadas.

O meio Sabouraud com gentamicina e cloranfenicol só é cultivado quando o exame micológico é solicitado pelo clínico.

A identificação e antibiograma são realizados, caso se valorize o microrganismo isolado, tendo em conta a coloração de Gram e o crescimento microbiano nos diferentes meios de cultura.

d.3.2.2. Pesquisa de Bacilos Ácido-Álcool Resistentes (BAAR)

A pesquisa de Bacilos Ácido-Álcool Resistentes é feita em todas as expetorações que dão entrada no laboratório.

A pesquisa de micobactérias é uma atividade capaz de gerar aerossóis e, por isso, deve ser realizada na câmara de fluxo laminar vertical (Telstar Cytostar), segundo as práticas e procedimentos do Nível de Biossegurança 3. (Zimbro *et al.*, 2009)

d.3.2.2.1. Fluidificação e descontaminação de expetoração para pesquisa de BAAR

A expetoração é uma amostra oriunda de um local não estéril, pelo que se encontra contaminada com muco e pela microbiota comensal da orofaringe. Além disso, o número de BAAR numa expetoração é reduzido. Por estas razões, a pesquisa de micobactérias implica sempre um processo de fluidificação, descontaminação e concentração da amostra. (Ferri *et al.*, 2014)

No LACSL, o tratamento das amostras de expetoração para pesquisa de BAAR faz-se pelo método de Kubica, modificado por Krasnow, que se baseia na utilização simultânea dos reagentes de descontaminação N-acetil-L-cisteína e cloreto de benzalcónio (bioMérieux). A L-cisteína é um agente mucolítico de ação rápida e o cloreto de benzalcónio destrói a maioria dos microrganismos, com exceção das micobactérias. (Cadmus, Falodun e Fagade, 2011) O tampão fosfato (bioMérieux) é adicionado para estabilizar a amostra, através da neutralização do pH e diminuição da atividade dos reagentes de descontaminação. (Patterson, Thomson e Larsan, 1956) Se estiverem presentes na amostra, os BAAR estarão concentrados no sedimento formado após centrifugação (3000 r.p.m., durante vinte minutos). No exame direto, o esfregaço do sedimento é corado pelo método de Kinyoun e interpretado de acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) (**Tabela 14**).

Tabela 14 - Interpretação dos esfregaços de Bacilos Ácido-Álcool Resistentes

Quantificação dos BAAR observados (objetiva de imersão)	Interpretação (OMS)
0/esfregaço	Negativo
1-2/300 campos	Confirmação requerida
1-9/100 campos	BAAR em número reduzido
1-9/10 campos	Positivo (1+)
1-9/campo	Positivo (2+)
> 9/campo	Positivo (3+)

Adaptado de: Forbes, B. A. et al. - Practice Guidelines for Clinical Microbiology Laboratories: *Mycobacteria* (2018).

BAAR (Bacilos Ácido-Álcool Resistentes), **OMS** (Organização Mundial da Saúde).

Para a realização do exame cultural, o sedimento obtido é cuidadosamente suspenso em albumina bovina a 0,2% (bioMérieux) e parte da mistura é diluída em água destilada estéril (1:10). Duas séries de tubos de meio Löwenstein-Jensen são semeadas - uma com suspensão não diluída e outra com a mistura diluída - e incubadas a 37°C, por oito semanas, com inspeção semanal. Para permitir a entrada de oxigénio, a tampa do frasco de cultura deve manter-se sempre desenroscada.

O meio Löwenstein-Jensen (inclinado em tubo) é um meio seletivo que favorece o isolamento de bactérias do género *Mycobacterium*. O glicerol e ovo incorporados no meio fornecem ácidos gordos e proteínas essenciais para o metabolismo das micobactérias. (Zimbro et al., 2009) Da composição do meio também faz parte o verde malaquite, um corante que lhe confere a cor verde característica e que inibe a microbiota contaminante. (Ferri et al., 2014)

Neste meio, as colónias de *Mycobacterium tuberculosis* são tipicamente rugosas e não pigmentadas (aspeto “em couve-flor”). (Bento *et al.*, 2011)

d.4. Exsudados faríngeos, nasais e auriculares

Grande parte das infeções das vias respiratórias superiores são autolimitadas e de etiologia viral. Porém, outras podem ser provocadas por agentes bacterianos. (Levy, 2004) A verdade é que o diagnóstico bacteriológico das vias respiratórias superiores representa uma tentativa de identificar o(s) agente(s) implicado(s) na infeção, entre uma microbiota indígena abundante. (Fonseca *et al.*, 2004)

d.4.1. Colheita

Os exsudados faríngeos devem ser colhidos com zaragatoa por detrás da úvula e entre os pilares (faringe posterior, amígdalas e qualquer zona ulcerada ou inflamada). Os exsudados nasais são obtidos através da inserção de uma zaragatoa estéril em cada narina, até se encontrar resistência. Na colheita de exsudados auriculares é introduzida e rodada uma zaragatoa no canal auditivo. (Fonseca *et al.*, 2004)

d.4.2. Processamento

Os exsudados são semeados em meio MacConkey, Chapman, gelose de sangue e gelose de chocolate. Os meios MacConkey e Chapman são incubados por 18 a 24 horas, a 37°C. A incubação das geloses de sangue e chocolate é feita a 37°C, durante 18 a 48 horas, numa atmosfera com 3 a 10% de CO₂.

Consoante o exame cultural e a observação do Gram procede-se à identificação e respetivo antibiograma.

Quando é requisitado exame micológico, as amostras são cultivadas em meio Sabouraud com gentamicina e cloranfenicol.

d.4.2.1. Pesquisa de *Streptococcus* β-hemolíticos do grupo A (*Streptococcus pyogenes*)

Os *Streptococcus* β-hemolíticos do grupo A de Lancefield são a principal causa de faringite bacteriana. (Fonseca *et al.*, 2004) A pesquisa destas bactérias é feita por solicitação específica do médico, a partir de exsudados faríngeos e através do teste imunocromatográfico Clearview® Exact Strep A (Alere).

Nesta pesquisa, a zaragatoa é colocada numa solução de extração, durante um minuto e não mais de 15 minutos, à temperatura ambiente. Este procedimento serve para extrair o antigénio de *Streptococcus pyogenes* do exsudado faríngeo. Após este período de incubação, toda a solução de extração é adicionada ao dispositivo de teste. Os resultados devem ser lidos e interpretados após um período de incubação de cinco a dez minutos.

Na extremidade da cassete estão presentes anticorpos policlonais de coelho anti-*Streptococcus pyogenes* conjugados a micropartículas de ouro coloidal. A região de teste é pré-revestida com anticorpos monoclonais anti-*Streptococcus pyogenes* e a zona controlo apresenta anticorpos contra o anticorpo policlonal anti-*Streptococcus pyogenes*. Se estiver presente na amostra, o antigénio da bactéria liga-se aos anticorpos policlonais anti-*Streptococcus pyogenes* e o complexo migra na membrana pela ação da capilaridade. Os anticorpos da região de teste capturam o complexo formado, o que leva ao aparecimento de uma linha de intensidade variável. Como a mistura continua a mover-se através da membrana, os anticorpos da região controlo reconhecem os anticorpos policlonais anti-*Streptococcus pyogenes* e forma-se a linha controlo. (Gupta, Talwar e Gupta, 1992) Quando são visíveis as linhas de teste e controlo, a pesquisa é positiva e válida.

d.5. Exsudados vaginais/endocervicais e uretrais

Na origem das infeções genito-urinárias existe um grande número de agentes microbianos (**Tabela 15**), os quais são responsáveis por uma considerável morbidade e mortalidade. (Schlicht *et al.*, 2004)

Lactobacillus spp. são a microbiota predominante da vagina e efetuam a manutenção do pH do lúmen vaginal. O pH da vagina situa-se entre 3,5 e 4,5 durante o período entre a puberdade e a menopausa. (Quan, 2010; Kumar *et al.*, 2011)

A vaginite é um distúrbio feminino comum, cujas causas mais frequentes são a candidíase vulvovaginal, a tricomoníase e a vaginose bacteriana. (Paladine e Desai, 2018)

A candidíase vulvovaginal é causada por *Candida albicans* em 70% a 90% dos casos. Nesta infeção ocorre prurido intenso, inflamação vulvar e vaginal, o pH é semelhante ao da vagina e o exsudado é purulento, esbranquiçado ou amarelado, de aspeto grumoso. (Quan, 2010; Paladine e Desai, 2018)

Na vaginite por *Trichomonas vaginalis* (tricomoníase), o exsudado é espumoso, verde ou amarelo, com um cheiro “sui generis”. Na tricomoníase verifica-se um aumento no número de leucócitos e, em 60% a 90% dos utentes, o pH é superior a 4,5. (Quan, 2010; Paladine e Desai, 2018)

A vaginose bacteriana corresponde a um desequilíbrio da microbiota da vagina, caracterizado pela diminuição de *Lactobacillus* spp. e pelo crescimento de uma microbiota mista com *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella* spp., *Bacteroides* spp., *Mobiluncus* spp. e *Mycoplasma hominis*. (Money, 2005; Quan, 2010; Muzny e Schwebke, 2016) Na vaginose bacteriana verifica-se a presença de “*clue cells*” (células epiteliais revestidas por bactérias), raros leucócitos, um pH superior a 4,5, um odor característico a “peixe podre” e um exsudado vaginal abundante, aquoso, esbranquiçado e homogêneo. (Money, 2005; Quan, 2010; Kumar et al., 2011)

Tabela 15 - Microrganismos envolvidos nas infecções genito-urinárias

Mulher		Homem		Referências
Vulvo-vaginites	<i>Candida albicans</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Mobiluncus</i> sp., <i>Actinomyces</i> spp., <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Prevotella</i> spp., <i>Bacteroides</i> spp., <i>Mycoplasma hominis</i>	Uretrites	<i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Ureaplasma</i> spp., <i>Mycoplasma</i> sp.	Fonseca et al., 2004 Schlicht et al., 2004
Endocervicites	<i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Ureaplasma</i> spp., <i>Mycoplasma</i> sp.		Money, 2005	
Uretrites	<i>Neisseriae gonorrhoeae</i> , <i>Ureaplasma</i> spp., <i>Mycoplasma</i> sp.		Quan, 2010	

d.5.1. Colheita

Na colheita de exsudado vaginal, a utente não deve fazer qualquer lavagem prévia, a não ser da genitália externa. A colheita é feita do fundo do saco posterior e endocolo, através de zaragatoa de alginato de cálcio ou dacron. Por outro lado, mais duas zaragatoas devem ser colhidas para o exame direto a fresco e após coloração. É de realçar que as amostras adequadas para a pesquisa de *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma* sp. e *Ureaplasma* spp. não são as secreções vaginais, mas sim os exsudados endocervicais e raspados, uma vez que estas bactérias se encontram nas células epiteliais. (Fonseca et al., 2004)

O exsudado uretral deve ser colhido, se possível, antes da primeira micção, com recurso a uma zaragatoa fina e flexível, cuidadosamente introduzida e rodada na uretra. Os restantes procedimentos são idênticos aos do exsudado vaginal. No homem, esta é a amostra adequada para a pesquisa de *Neisseria gonorrhoeae*. (Fonseca et al., 2004)

d.5.2. Processamento

d.5.2.1. Exame direto a fresco e após coloração de Gram

No exame direto a fresco faz-se a pesquisa de leucócitos, “*clue cells*”, bactérias, leveduras e *Trichomonas vaginalis* (protozoário flagelado com mobilidade) (análise entre lâmina e lamela, com a objetiva de 40X). (Kumar *et al.*, 2011; Paladine e Desai, 2018)

Numa preparação após coloração de Gram efetua-se a observação de leucócitos, “*clue cells*” e analisa-se a microbiota, verificando-se a predominância de algum tipo morfológico. A presença de “*clue cells*” permite realizar um diagnóstico presuntivo de infecções por *Gardenerella vaginalis* (cocobacilos de Gram variável) ou *Mobilluncus* sp. (bacilos curvos de Gram variável). (Fonseca *et al.*, 2004; Money, 2005)

No diagnóstico de vaginose bacteriana realiza-se a medição do pH do exsudado vaginal e o teste de hidróxido de potássio (KOH). Para medir o pH do exsudado vaginal utilizam-se as tiras de Combur (pH>4,5). No teste de KOH, a um pouco do exsudado, presente numa lâmina, adicionam-se umas gotas de KOH 10% e verifica-se o aparecimento de cheiro característico a “peixe podre”. (Money, 2005; Kumar *et al.*, 2011)

No exame cultural, as zaragoas vaginais/endocervicais e uretrais são semeadas em gelose de sangue, chocolate, MacConkey, Chapman e Sabouraud com gentamicina e cloranfenicol. As geloses de sangue e chocolate são incubadas a 37°C, por 24 a 48 horas, numa atmosfera com 3 a 10% de CO₂. Os meios de MacConkey e Chapman são incubados durante 18 a 24 horas a 37°C. O meio Sabouraud é incubado por 18 a 24 horas a 35°C e as culturas negativas são mantidas a 25-30°C, durante cinco dias, antes de serem rejeitadas.

A gelose Sabouraud com gentamicina e cloranfenicol é um meio seletivo para o isolamento de leveduras e bolores, a partir de amostras polimicrobianas. As peptonas e dextrose do meio favorecem o crescimento de estirpes fúngicas. Pelo contrário, o baixo pH e a adição de agentes antimicrobianos (gentamicina e cloranfenicol) aumentam a inibição bacteriana. (Brun *et al.*, 2001) A gentamicina é um antibiótico do grupo dos aminoglicosídeos e possui um amplo espectro de atividade contra muitas bactérias Gram (-). (Merz, Sandford e Evans, 1976) Como certos microrganismos podem ser resistentes a este antibiótico, o cloranfenicol potencia a seletividade da gelose através da inibição de uma ampla gama de bactérias Gram (+) e Gram (-). (Zimbro *et al.*, 2009)

Consoante os resultados do exame direto (a fresco e após coloração de Gram), do exame cultural e de testes de orientação adicionais, a identificação e o antibiograma do agente patogénico isolado são efetuadas.

d.5.2.2. Pesquisa de *Streptococcus* β -hemolíticos do grupo B (*Streptococcus agalactiae*)

A colonização da mulher grávida por *Streptococcus* β -hemolíticos do grupo B é responsável pela ocorrência de graves infeções no recém-nascido. Como o recém-nascido é infetado sobretudo durante o trabalho de parto, a pesquisa de *Streptococcus agalactiae* é importante para a identificação de grávidas portadoras assintomáticas. (Areal *et al.*, 2010)

No LACSL, a pesquisa desta bactéria em mulheres grávidas faz-se através da cultura de exsudados vaginais/perianais em gelose Granada. A região da placa semeada é coberta com uma lamela porque a produção de pigmentos é estimulada em ambiente de anaerobiose. A leitura da placa ocorre após a sua incubação a 37°C por 18 a 24 horas. Depois deste período, se a pesquisa for negativa, a placa deve ser reincubada até 72 horas.

A gelose Granada é um meio seletivo para a deteção de *Streptococcus agalactiae*. A mistura antibiótica torna o meio seletivo ao inibir a maioria das bactérias Gram (-) e leveduras. A presença de metotrexato, amido e soro permitem a produção de um pigmento carotenoide laranja, específico das estirpes hemolíticas de *Streptococcus* do grupo B. Deste modo, a pesquisa é considerada positiva quando se formam colónias cor-de-laranja (**Figura 8**). (Zimbro *et al.*, 2009)



Figura 8 - Amostras de exsudado vaginal/perianal inoculadas em gelose Granada para pesquisa de estreptococos β -hemolíticos do grupo B (fotografado no LACSL). As colónias incolores e sem pigmentação (colónias rodeadas pelo círculo) são negativas para a pesquisa de *Streptococcus agalactiae*. Pelo contrário, a pesquisa é positiva quando se formam colónias produtoras de pigmento laranja (colónias indicadas pela seta).

d.5.2.3. Pesquisa de *Mycoplasma* sp. e *Ureaplasma* spp.

A prevalência e potencial patogénico dos micoplasmas não estão elucidados na totalidade. Apesar disso, sabe-se que este grupo bacteriano coloniza o trato genital do Homem e que *Mycoplasma* sp. e *Ureaplasma* spp. têm a capacidade de causar uretrite e cervicite não gonocócicas. (Schlicht *et al.*, 2004)

No LACSL, o diagnóstico de micoplasmas urogenitais efetua-se através do dispositivo de teste Mycoplasma IST 2 (bioMérieux), o qual pode ser utilizado a partir de amostras vaginais/endocervicais e uretrais. Este dispositivo permite a cultura, identificação e contagem de *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma hominis*, bem como a determinação da sensibilidade a certos antibióticos.

No dispositivo *Mycoplasma* IST 2 está disponível um caldo de cultura seletivo (reagentes R1 e R2) associado a uma galeria que contém vinte e dois testes. O caldo do frasco R1 contém elementos nutritivos estáveis e permite a reconstituição do reagente R2. O frasco R2 contém caldo ureia-arginina sob a forma liofilizada. Após a colheita, a zaragatoa é colocada no reagente R1 e uma parte (3 mL do reagente R1 semeado) é transferida para o reagente R2, o qual é agitado até à total dissolução do liofilizado. Após a sementeira, o caldo é distribuído por cada uma das cúpulas da galeria (55 µL). A cada cúpula são adicionadas duas gotas de óleo de parafina e a galeria é incubada, juntamente com o resto do frasco, durante 24 e 48 horas a 37°C. A leitura efetua-se às 24 horas para a cúpula de identificação de *Ureaplasma* spp. e às 24 e 48 horas para as restantes cúpulas.

O pH, substratos e vários fatores de crescimento do caldo possibilitam o excelente desenvolvimento dos micoplasmas. A seletividade é assegurada pela associação de uma mistura de antibióticos e um antifúngico. Em caso de cultura positiva, a presença de substratos específicos (arginina para *Mycoplasma hominis* e ureia para *Ureaplasma* spp.) e do indicador vermelho de fenol permite detetar uma mudança de cor do caldo, relacionada com um aumento do pH. (Fiacco *et al.*, 1984) A galeria inclui vinte e dois testes e divide-se em três partes - identificação (controlo de crescimento e identificação de *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma hominis*), contagem indicativa (para determinar se o título do micoplasma na amostra é igual ou superior ao limiar estabelecido de 10⁴ UFC/mL) e testes de sensibilidade antimicrobiana.

d.5.2.4. Pesquisa de *Chlamydia trachomatis*

A infeção por *Chlamydia trachomatis* coexiste muitas vezes com a gonorreia e encontra-se elevada em adultos jovens sexualmente ativos. (Levy, 2004)

No LACSL, a pesquisa de *Chlamydia trachomatis* realiza-se mediante requisição clínica. A pesquisa é feita pelo teste imunocromatográfico RightSign *Chlamydia* Rapid Test (Monlab), a partir de exsudados endocervicais/uretrais. Se for solicitada a pesquisa da bactéria por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), a amostra é remetida para o serviço externo.

Para extrair o antígeno de *Chlamydia trachomatis* da amostra, a zaragatoa é mergulhada na solução de extração e a mistura fica em repouso durante 10 a 15 minutos, à temperatura ambiente (fase de extração). Parte do extrato é adicionado ao poço do dispositivo e os resultados devem ser interpretados após 10 minutos.

No dispositivo de teste estão disponíveis micropartículas revestidas com anticorpos anti-*Chlamydia trachomatis*. Impregnados na linha de teste encontram-se anticorpos monoclonais específicos para o antígeno da bactéria e a zona controlo apresenta anticorpos contra os anticorpos anti-*Chlamydia trachomatis*. Após a extração, o antígeno da amostra reage com as micropartículas revestidas com o anticorpo anti-*Chlamydia*. Durante a reação, o complexo formado percorre a membrana por capilaridade e é capturado pelos anticorpos da região de teste. As micropartículas revestidas com anticorpos anti-*Chlamydia trachomatis*, ao serem capturadas na região controlo, levam à formação da linha controlo. (Sanders et al., 1994) A pesquisa é válida e positiva se aparecerem as linhas de teste e controlo.

d.6. Supurações

As infeções que conduzem à formação de exsudados purulentos estão associadas a diversas situações clínicas e vários microrganismos. (Fonseca et al., 2004)

O pus de feridas corresponde à amostra processada com maior frequência no LACSL.

d.6.1. Colheita

Para a colheita de amostras de pus, uma zaragatoa deve ser introduzida na ferida. Grânulos amarelos, cinzentos, brancos ou negros, se forem observados, devem ser colhidos para estudo micológico. (Fonseca et al., 2004)

d.6.2. Processamento

O pus é semeado em gelose de sangue, chocolate, MacConkey e Chapman. Os meios de MacConkey e Chapman são incubados durante 18 a 24 horas a 37°C. As geloses de sangue e chocolate são incubadas a 37°C, por 24 a 48 horas, numa atmosfera com 3 a 10% de CO₂.

A cultura em Sabouraud com gentamicina e cloranfenicol apenas é realizada quando é pedido exame micológico.

A identificação e antibiograma dos microrganismos isolados efetua-se tendo em consideração o exame cultural, o exame direto após coloração de Gram e os resultados de eventuais testes de orientação. É de salientar que neste tipo de amostra são sempre valorizados os microrganismos isolados de locais normalmente estéreis e bactérias com uma enorme probabilidade de serem patogénicas (*Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo), independentemente do número presente. (Fonseca et al., 2004)

d.7. Outros produtos

Outras amostras que também podem ser analisadas no LACSL são raspados cutâneos, unhas e cabelo. Este tipo de produtos dão entrada no laboratório para exame micológico, pelo que são semeados em meio Sabouraud com gentamicina e cloranfenicol. Na pesquisa de leveduras, o meio é incubado por 24 horas a 25-30°C. Se não for detetado crescimento após este período, o meio é reincubado por mais 24 horas (25-30°C), até ser rejeitado. Na pesquisa de dermatófitos e outros fungos filamentosos, o meio é incubado durante 4 semanas a 25-30°C. Neste caso, a pesquisa é considerada negativa se não for observado crescimento após 4 semanas de incubação.

Quando se observa crescimento no meio, o aspeto macroscópico (frente e verso), as características morfológicas das estruturas fúngicas e o tempo de crescimento são informações que servem de auxílio na identificação dos microrganismos isolados.

e. Identificação e antibiograma

e.1. Testes de diferenciação e orientação

Certas provas manuais servem de orientação para a diferenciação e possível identificação dos microrganismos. Além disso, estes testes são importantes para a correta seleção das cartas a usar no analisador Vitek 2-compact. Os testes de diferenciação e orientação efetuados no LACSL são enunciados de seguida.

e.1.1. Teste da catalase

A catalase é uma enzima solúvel intracelular capaz de decompor o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). A pesquisa de bactérias produtoras desta enzima é realizada no teste da catalase. O critério para o teste ser considerado positivo consiste em observar a libertação de bolhas de oxigénio, quando as bactérias são colocadas em contacto com água oxigenada (peróxido de hidrogénio). (Azadi et al., 2018) Este teste

serve para diferenciar as bactérias que pertencem à família *Micrococcaceae* (catalase positiva) e à família *Streptococcaceae* (catalase negativa).

e.1.2. Teste da oxidase

As citocromo-oxidases são hemoproteínas que atuam como transportador de elétrons na cadeia de respiração aeróbica, transferindo hidrogénio para o oxigénio com formação de água. O teste da oxidase é de grande utilidade no *screening* de microrganismos suspeitos de pertencerem à família *Enterobacteriaceae* (teste negativo) e na identificação de bactérias suspeitas de pertencerem a outros géneros como *Pseudomonas*, *Neisseria* e *Campylobacter* (teste positivo). (Poole, 1983)

O teste da oxidase utiliza a solução de hidrocloreto de tetrametil-*p*-fenilenodiamina (bioMérieux), um reagente que substitui o oxigénio como aceitador artificial de elétrons. No estado reduzido, o reagente é incolor, mas na presença da citocromo oxidase e oxigénio atmosférico, a *p*-fenilenodiamina é oxidada e forma-se o azul de indofenol. Bactérias com atividade da citocromo oxidase desenvolvem uma cor azul profunda no local da inoculação, em cerca de 10 segundos. (Fonseca *et al.*, 2004)

e.1.3. Teste ureia-indol

O meio ureia-indol (bioMérieux) permite efetuar uma diferenciação presuntiva das bactérias que possuem as enzimas urease e triptofanase.

A ureia disponível no meio é hidrolisada pelas bactérias que possuem a enzima urease e desta reação liberta-se amónia. A amónia reage em solução para formar carbonato de amónio, o que resulta na alcalinização e aumento do pH do meio. A alcalinização do meio é detetada através da alteração de cor no indicador de pH vermelho de fenol (o meio fica vermelho a violeta). Os microrganismos que rapidamente hidrolisam a ureia podem produzir reações positivas dentro de 1 ou 2 horas, enquanto que as espécies menos ativas podem necessitar de 3 ou mais dias. (Stuart, Stratum e Rustigian, 1944) Esta prova serve para diferenciar as espécies de *Salmonella* e *Shigella* (teste negativo) das restantes bactérias fermentadoras da lactose (teste positivo).

O meio também contém o aminoácido triptofano que é desaminado pelas bactérias que possuem a enzima triptofanase. Um dos produtos de degradação metabólica do aminoácido triptofano é o indol, um benzil pirrol. (Isenberg e Sundheim, 1958) A produção de indol caracteriza-se pelo aparecimento de uma cor vermelha na superfície do meio, revelado pela adição do reagente de Kovacs. O desenvolvimento do complexo vermelho baseia-se na

reação do indol com o grupo aldeído do *p*-dimetilaminobenzaldeído, o produto químico ativo do reagente de Kovacs (bioMérieux). (Fonseca *et al.*, 2004) A formação de indol é uma característica importante na identificação de muitas espécies de microrganismos e é útil, em particular, na separação de *Escherichia coli* (teste positivo) de membros do grupo *Klebsiella-Enterobacter-Hafnia-Serratia* (teste negativo na maioria dos casos). (Isenberg e Sundheim, 1958)

e.1.4. Slidex Staph

Pastorex™ Staph-Plus (Bio-Rad) é um teste rápido de aglutinação para a identificação de *Staphylococcus aureus*. Para realizar esta pesquisa, aos reagentes de teste adicionam-se colônias sugestivas de *Staphylococcus aureus*. O aparecimento de aglutinação em 30 segundos é indicativo de um resultado positivo.

Da composição de *Staphylococcus aureus* fazem parte o “clumping factor” (fator com afinidade para o fibrinogênio), a proteína A (com afinidade para imunoglobulina G) e polissacarídeos. Este teste é constituído por partículas de látex revestidas com fibrinogênio, imunoglobulina G e anticorpos monoclonais específicos contra os polissacarídeos capsulares de *Staphylococcus aureus*. As partículas de látex reagem com o fator de aglutinação (“clumping factor”), a proteína A e os polissacarídeos da bactéria, permitindo a sua deteção simultânea. (Essers e Radebol, 1980)

e.1.5. Prova da filamentação

A prova da filamentação permite fazer a identificação presumível de estirpes de *Candida albicans*. (Sheppard *et al.*, 2008) Nesta prova efetua-se uma suspensão da estirpe fúngica e adicionam-se 4 gotas da suspensão a 0,5 mL de soro humano. Após um período de incubação de 4 horas, a 37°C, monta-se uma gota do preparado entre lâmina e lamela e observa-se ao microscópio (objetiva de imersão). A prova da filamentação é positiva se for observado um tubo germinativo. Para confirmar o diagnóstico, a identificação do microrganismo isolado é realizada através de uma carta YST (**Tabela 16**), no aparelho Vitek 2-compact.

e.2. Analisador automatizado Vitek 2-compact

A identificação e determinação da suscetibilidade antimicrobiana são realizadas pelo analisador Vitek 2-compact (bioMérieux), no qual os microrganismos são identificados com base nas suas características metabólicas e perfil bioquímico. (Ligozzi *et al.*, 2002)

Para tal, a partir das culturas puras dos microrganismos isolados são preparadas suspensões em solução de cloreto de sódio 0,45%, com diferentes densidades. A suspensão é de 0,50-0,63 McFarland para as bactérias e de 1,80-2,20 McFarland para as leveduras.

As cartas de identificação e antibiograma (**Tabela 16**) são escolhidas de acordo com a suspeita do microrganismo. As cartas de identificação são compostas por poços carregados com testes bioquímicos convencionais que permitem identificar os agentes patogénicos através das suas características metabólicas e perfil bioquímico. (Ligozzi *et al.*, 2002) As cartas de antibiograma são compostas por poços com concentrações antibióticas conhecidas. (Livermore *et al.*, 2002) Após as cartas serem introduzidas no aparelho, a análise começa com a aspiração e posterior inoculação das suspensões microbianas nos respetivos poços. De seguida, o analisador faz a incubação de cada uma das cartas. A monitorização contínua do crescimento microbiano é realizada por espectrofotometria (medição da intensidade da luz que atinge certos substratos presentes nos poços) e a suscetibilidade antimicrobiana é estudada por turbidimetria (medição da redução na intensidade de um feixe incidente de luz, à medida que ocorre a sua passagem pelos poços). (Livermore *et al.*, 2002; Burtis e Bruns, 2014) No final do ciclo de incubação, o padrão biológico do microrganismo desconhecido é comparado com vários conjuntos de estirpes de microrganismos bem caracterizados (banco de dados), sendo obtido um valor quantitativo que indica a proximidade entre o agente a identificar e cada um dos microrganismos do banco de dados. Os valores de Concentração Mínima Inibitória (CMI) são determinados para cada antibiótico e os resultados são emitidos de acordo com as normas da agência europeia EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).

f. CQI na secção de Microbiologia

No LACSL, a solução de cloreto de sódio 0,45% (solução de suspensão) é semeada diariamente em meio CLED, antes da realização das suspensões microbianas e após esta tarefa. A leitura da placa é efetuada depois de 18 a 24 horas de incubação. Este procedimento serve para validar os testes efetuados e para averiguar se a solução pode ou não continuar a ser utilizada nas manipulações posteriores.

O controlo da câmara de fluxo laminar consiste em colocar três placas de meio CLED e COS no seu interior, no final de um dia de trabalho. A leitura das placas é realizada no início da manhã do dia seguinte. Caso as placas não apresentem crescimento microbiano, a câmara pode continuar a ser normalmente usada.

Pelo facto de não serem desejáveis alterações bruscas da temperatura da estufa, a medição e o controlo desta grandeza física é efetuada de modo contínuo.

As cartas do aparelho Vitek 2-compact são controladas a cada novo lote. Neste processo são utilizadas estirpes ATCC (American Type Culture Collection), cujas culturas são padronizadas quanto às suas características de crescimento, fermentação de açúcares, propriedades bioquímicas e sensibilidade a agentes antimicrobianos. Após a inoculação das placas de cultura e a realização das suspensões microbianas, as cartas são testadas e os seus resultados avaliados. Para tal, os resultados obtidos são comparados com os resultados esperados para cada estirpe ATCC.

Tabela 16 - Cartas de identificação e antibiograma do aparelho Vitek 2-compact

Cartas (bioMérieux)	Aplicação	Exemplos
GN	Identificação de bacilos Gram (-) fermentadores e não fermentadores	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Serratia marcescens</i>
GP	Identificação de microrganismos Gram (+)	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
YST	Identificação de leveduras	<i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Malassezia furfur</i>
AST-N359	Determinação da sensibilidade de bacilos Gram (-) aeróbios a agentes antimicrobianos	Ciprofloxacina, trimetoprim/ sulfametoxazol
AST-P586	Determinação da sensibilidade de <i>Enterococcus</i> spp., e <i>Streptococcus agalactiae</i> a agentes antimicrobianos	Tetraciclina, eritromicina
AST-P648	Determinação da sensibilidade de <i>Staphylococcus</i> spp. a agentes antimicrobianos	Levofloxacina, nitrofurantoína
AST-ST03	Determinação da sensibilidade de <i>Streptococcus</i> β -hemolíticos, <i>Streptococcus pneumoniae</i> e <i>Streptococcus viridans</i> a agentes antimicrobianos	Ampicilina, clindamicina

f. Caso clínico

Uma expetoração de um utente de 92 anos, do sexo masculino, deu entrada no laboratório.

A amostra foi semeada em gelose de sangue, gelose de chocolate, meio MacConkey e Chapman. As geloses de sangue e chocolate foram incubadas a 37°C, numa atmosfera com 3 a 10% de CO₂, por cerca de 24 horas. Os restantes meios foram incubados em aerobiose, durante 24 horas, a 37°C.

No meio de Chapman foi observado um desenvolvimento abundante - possível *Staphylococcus aureus* (**Figura 9**).

No exame microscópico direto, após coloração de Gram, foram observados vários cocos Gram (+).

A realização de um Slidex Staph permitiu confirmar a suspeita, uma vez que o teste deu positivo (ocorrência de aglutinação). Através do Slidex Staph positivo foi identificado um *Staphylococcus aureus*.

Para a realização do antibiograma foi utilizada a carta P648 e as suspensões bacterianas foram efetuadas a partir das colónias presentes no meio de Chapman. Os resultados do antibiograma estão disponíveis na **Tabela 17**.

Portanto, da expetoração do utente foi isolado *Staphylococcus aureus* metilina resistente (**Tabela 17**).



Figura 9 - Colónias sugestivas de *Staphylococcus aureus* em gelose de Chapman (fotografado no LACSL). Os microrganismos que fermentam o manitol provocam uma mudança na cor do indicador de pH vermelho de fenol e formam colónias amarelas. A formação deste tipo de colónias serve de orientação para a identificação de *Staphylococcus aureus*.

Tabela 17 – Antibiograma do *Staphylococcus aureus* isolado da expetoração

Teste de screening de cefoxitina	Positivo
Sensível	Gentamicina, linezolid, daptomicina, teicoplanina, vancomicina, tetraciclina, ácido fusídico, rifampicina, trimetoprim/sulfametoxazol
Resistente	Benzilpenicilina, oxacilina, levofloxacina, moxifloxacina, eritromicina, clindamicina

3.3. Fase pós-analítica

Na fase pós-analítica, os resultados são validados pelos especialistas em Análises Clínicas.

Na validação verifica-se se os resultados são coerentes com a idade e o sexo dos utentes; a história clínica, o diagnóstico e o tratamento (quando fornecidos); e o histórico de resultados (sempre que se encontrar disponível).

Os erros das fases pré-analítica e analítica têm uma grande influência nos resultados. Nesta fase é possível avaliar se a colheita e o processamento das amostras ocorreram em condições adequadas, tendo em conta a presença de possíveis interferentes (hemólise e lipemia, por exemplo) e os resultados dos controlos internos.

Assim, a fase pós-analítica assegura a qualidade e legitimidade de todos os resultados. Por fim, todas as análises requisitadas são emitidas nos relatórios de cada utente, dentro dos prazos previstos.

4. Conclusão

As Análises Clínicas são uma área interdisciplinar e uma peça-chave no diagnóstico, sendo enorme o seu contributo na prestação de cuidados de saúde.

Com a realização deste mestrado tive a possibilidade de sedimentar os conhecimentos adquiridos com a licenciatura em Ciências Biomédicas e de enriquecer a minha formação no âmbito das Análises Clínicas.

“Diz-me e vou esquecer. Mostra-me e poderei lembrar-me. Envolve-me e vou entender”... Este provérbio reflete a minha experiência de estágio no LACSL. Ao longo do estágio frequentei todas as áreas do laboratório, o que me permitiu acompanhar as rotinas de controlo e manutenção dos aparelhos e técnicas manuais, processar as diferentes amostras e analisar os respetivos resultados. Portanto, com esta experiência além de ter aplicado e consolidado os conhecimentos adquiridos durante o mestrado, também obtive outras competências teóricas e práticas. O contacto com a dinâmica de trabalho do laboratório tornou-me mais consciente quanto ao enorme valor de uma equipa competente e responsável, bem como quanto à importância das rotinas de controlo da qualidade na prestação de um serviço de excelência.

Para uma melhor interpretação e validação dos resultados considero que o clínico deve fornecer ao laboratório mais informações sobre o utente, como o diagnóstico tentativo, condições subjacentes ou antibioterapia. Por outro lado, também é essencial ter em atenção que o nosso trabalho é para o bem de alguém, uma vez que o número de cada processo representa um utente que depositou confiança no laboratório.

Considero que esta experiência foi bastante enriquecedora e que os objetivos traçados foram cumpridos. Com o final desta etapa conquistei “um dos degraus da escada do conhecimento”, isto porque devemos procurar sempre enriquecer a nossa formação, com o objetivo de nos tornarmos profissionais cada vez mais competentes.

5. Bibliografia

- AREAL, A. *et al.* (2010) - Infecção perinatal por *Streptococcus agalactiae* pode ser evitada: Prevalência da colonização em parturientes no Hospital São Marcos, factores de risco e a sua relação com a infecção perinatal. "Acta Pediátrica Portuguesa" 41 (2010) 16-21.
- AVENT, N. D. & REID, M. E. (2000) - The Rh blood group system: a review. "Blood" 95 (2000) 375-387.
- AYTEKIN, M. (2018) - The Current Use and the Evolution of Erythrocyte Sedimentation Rate Measurement. "Middle Black Sea Journal of Health Science" 4 (2018) 17-23.
- AZADI, D. *et al.* (2018) - Mycobacteriosis and Tuberculosis: Laboratory Diagnosis. "The Open Microbiology Journal" 12 (2018) 41-58.
- BACALL, N. S. (2009) - Analisador automático hematológico e a importância de validar novos equipamentos em laboratórios clínicos. "Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia" 31 (2009) 218-220.
- BAIN, B. J. (2006) - Blood Cells: A Practical Guide. 4ª edição. Massachusetts, EUA: Blackwell publishing, 2006. ISBN: 978-1-4051-4265-6.
- BAIN, B. J. *et al.* (2017) - Dacie and Lewis Practical Haematology. 12ª edição. China: Elsevier Churchill Livingstone, 2017. ISBN: 978-0-7020-6696-2.
- BARON, S. *et al.* (1996) - Medical Microbiology. 4ª edição. EUA: Divisão Médica da Universidade do Texas em Galveston, 1996. ISBN: 0-9631172-1-1.
- BARREIRA, R. *et al.* (2004) - Monitorização da Terapêutica com Anticoagulantes Orais: Consulta de Anticoagulação vs Médico Assistente. "Acta Médica Portuguesa" 17 (2004) 413-416.
- BARTHOLOMEW, J. W. & MITTWER, T. (1952) - The Gram Stain. "Bacteriological Reviews" 16 (1952) 1-29.
- BENNER, E. J. (1970) - Simple disposable method for quantitative cultures of urine. "Journal of Applied Microbiology" 19 (1970) 409-412.
- BENTO, J. *et al.* (2011) - Métodos Diagnósticos em Tuberculose. "Acta Médica Portuguesa" 24 (2011) 145-154.

BERGER, D. (1999) - A brief history of medical diagnosis and the birth of the clinical laboratory, Part I - Ancient times through the 19th century. "Medical Laboratory Observer" 31 (1999) 28-30, 32, 34-40.

BICER, S. *et al.* (2011) - Incidence assessment of rotavirus and adenovirus associated acute gastroenteritis cases in early childhood. "InfezMed" 19 (2011) 113-119.

BORGES, L. F. & SIQUEIRA, L. O. (2009) - Validação de tecnologia 5diff do analisador hematológico Sysmex XS-1000i para laboratório de pequeno/médio porte Validation of 5diff technologies of the Sysmex XS-1000i hematology analyzer for small and medium laboratories. "Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia" 31 (2009) 247-251.

BRIAND, H. *et al.* (2015) - Rapid detection of *H. pylori* Ag in human stool with the new bioNexia[®] *H. pylori* Ag test. Poster apresentado no congresso EHMSG congress, Nicosia (Cyprus), 2015.

BRUN, S. *et al.* (2001) - Evaluation of five commercial Sabouraud gentamicin-chloramphenicol agar media. "European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases" 20 (2001) 718-723.

BURTIS, C. A. & BRUNS, D. E. (2014) - Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 7^a edição. Londres: Elsevier Health Sciences, 2014. ISBN: 978-1-4557-4165-6.

CADMUS, S. I.; FALODUN, O. I. & FAGADE, O. E. (2011) - Methods of sputum decontamination with emphasis on local tuberculosis laboratories. "African Journal of Medicine and Medical Sciences" 40 (2011) 5-14.

CARRARO, P.; ZAGO, T. & PLEBANI, M. (2012) - Exploring the initial steps of the testing process: frequency and nature of preanalytic errors. "Clinical Chemistry" 58 (2012) 638-642.

CHAPMAN, G. H. (1945) - The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. "Journal of Bacteriology" 50 (1945) 201-203.

CHIARADIA, L. *et al.* (2017) - Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. "Scientific Reports – Nature" 7 (2017) 12807.

DAVIS, A. S.; VIERA, A. J. & MEAD, M. D. (2014) - Leukemia: An Overview for Primary Care. "American Family Physician" 89 (2014) 731-738.

- DEKKER, J. & FRANK, K. (2015) - *Salmonella, Shigella, and Yersinia*. "Clinics in Laboratory Medicine" 35 (2015) 225-246.
- DIACONU, S. et al. (2017) - *Helicobacter pylori* infection: old and new. "Journal of Medicine and Life" 10 (2017) 112-117.
- DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE (2012) - Prescrição e Determinação da Hemoglobina Glicada A1c. Lisboa: DGS, 2012. [Acedido a: 06/04/2019]. Disponível na internet: <https://www.dgs.pt/programa-nacional-para-a-diabetes/circulares-normas-e-orientacoes.aspx>
- DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE (2013) - Prescrição e determinação do hemograma. Lisboa: DGS, 2013. [Acedido a: 11/06/2019]. Disponível na internet: <https://www.dgs.pt/normas-clinicas/normas-clinicas.aspx>
- DUSSE, L. M. et al. (2013) - Gumprecht shadows: when to use this terminology? "Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial" 49 (2013) 320-323.
- EDRA, B. et al. (2017) - Hospital waste management - Case study. "Biomedical and Biopharmaceutical Research" 14 (2017) 23-36.
- ELLIS, R. C. & ZABROWARNY, L. A. (1993) - Safer staining method for acid fast bacilli. "Journal of Clinical Pathology" 46 (1993) 559-560.
- ELLNER, P. D. et al. (1966) - A new culture medium for medical bacteriology. "American Journal of Clinical Pathology" 45 (1966) 502-504.
- ESSERS, L. & RADEBOLD, K. (1980) - Rapid and Reliable Identification of *Staphylococcus aureus* by a Latex Agglutination Test. "Journal of Clinical Microbiology" 12 (1980) 641-643.
- FACCIOLÀ, A. et al. (2017) - *Campylobacter*: from microbiology to prevention. "Journal of Preventive Medicine and Hygiene" 58 (2017) E79-E92.
- FACKLAM, R. R. et al. (1979) - Presumptive Identification of Group A, B, and D Streptococci on Agar Plate Media. "Journal of Clinical Microbiology" 9 (1979) 665-672.
- FERNANDES, S. et al. (2012) - Protocolo de parasitoses intestinais. "Acta Pediátrica Portuguesa" 43 (2012) 35-41.
- FERRI, A. O. et al. (2014) - Diagnóstico da tuberculose: uma revisão. "Revista Liberato" 15 (2014) 105-212.
- FIACCO, V. et al. (1984) - Comparison of Media for Isolation of *Ureaplasma urealyticum* and Genital *Mycoplasma* Species. "Journal of Clinical Microbiology" 20 (1984) 862-865.

FLORES-MIRELES, A. L. *et al.* (2015) - Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment option. "Nature Reviews Microbiology" 13 (2015) 269–284.

FONSECA, A. B. *et al.* (2004) - Orientações para a elaboração de um Manual de Boas Práticas em Bacteriologia. Lisboa: Programa Nacional de Controlo da Infeção (PNCI) - Instituto Nacional de Saúde, Dr. Ricardo Jorge, Observatório Nacional da Saúde (ONSA), 2004. [Acedido a: 23/05/2019]. Disponível na internet: <https://www.dgs.pt/programa-nacional-de-controlo-da-infeccao/documentos/manuais-de-boas-praticas/orientacoes-para-a-elaboracao-de-um-manual-de-boas-praticas-em-bacteriologia.aspx>

FORBES, B. A. *et al.* (2018) - Practice Guidelines for Clinical Microbiology Laboratories: *Mycobacteria*. "Clinical Microbiology Reviews" 31 (2018) pii: e00038-17.

FOXMAN, B. (2014) - Urinary Tract Infection Syndromes: Occurrence, Recurrence, Bacteriology, Risk Factors and Disease Burden. "Infectious Disease Clinics of North America" 28 (2014) 1-13.

GOLDSTEIN, D. E. *et al.* (2004) - Tests of Glycemia in Diabetes. "Diabetes Care" 27 (2004) 1761-1773.

GROTTO, H. Z. W. (2009) - O hemograma: importância para a interpretação da biópsia. "Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia" 31 (2009) 178-182.

GUPTA, R.; TALWAR, G. P. & GUPTA, S. K. (1992) - Rapid antibody capture assay for detection of group A streptococci using monoclonal antibody and colloidal gold-monospecific polyvalent antibody conjugate. "Journal of Immunoassay" 13 (1992) 441-445.

HANDIN, R. I.; LUN, S. E. & STOSSEL, T. P. (2003) - Blood: Principles and Practice of Hematology. 2ª edição. Filadélfia, EUA: Lippincott Williams & Wilkins, 2003. ISBN: 0-7817-1993-3.

HAQUE, R. (2007) - Human Intestinal Parasites. "Journal of Health, Population and Nutrition" 25 (2007) 387-391.

HIRSH, J. *et al.* (2001) - Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. "Chest" 119 (2001) 8S-21S.

HOFFBRAND, A. V. & MOSS, P. A. H. (2011) - Essential haematology. 6ª edição. EUA: Wiley-Blackwell, 2011. ISBN: 978-1405198905.

ISENBERG, H. D. & SUNDHEIM, L. H. (1958) - Indole Reactions in Bacteria. "Journal of Bacteriology" 75 (1958) 682-690.

- ISENBERG, H. D.; KOMINOS, S. & SIEGEL, M. (1969) - Isolation of Salmonellae and Shigellae from an artificial mixture of fecal bacteria. "Journal of Applied Microbiology" 18 (1969) 656-659.
- JEPPSSON, J.-O. *et al.* (2002) - Approved IFCC Reference Method for the Measurement of HbA1c in Human Blood. "Clinical Chemistry and Laboratory Medicine" 40 (2002) 78-89.
- JOHN, W. G. *et al.* (1997) - Evaluation of the Menarini-Arkray HA 8140 hemoglobin A1c analyzer. "Clinical Chemistry" 43 (1997) 968-975.
- JONES, H. E. & PARK, R. W. A. - The Influence of Medium Composition on the Growth and Swarming of Proteus. "Journal of General Microbiology" 47 (1967) 369-378.
- KAWATSU, K. *et al.* (2008) - Development and Evaluation of Immunochromatographic Assay for Simple and Rapid Detection of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in Human Stool Specimens. "Journal of Clinical Microbiology" 46 (2008) 1226-1231.
- KIM, J. *et al.* (2014) - Evaluation of an Immunochromatographic Assay for the Rapid and Simultaneous Detection of Rotavirus and Adenovirus in Stool Samples. "Annals of Laboratory Medicine" 34 (2014) 216-222.
- KING, S. & METZGER, W. I. (1968) - A New Plating Medium for the Isolation of Enteric Pathogens. II. Comparison of Hektoen Enteric Agar with SS and EMB Agar. "Journal of Applied Microbiology" 16 (1968) 579-581.
- KUMAR, N. *et al.* (2011) - Bacterial vaginosis: Etiology and modalities of treatment-A brief note. "Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences" 3 (2011) 496-503.
- LAPIEERE, Y. *et al.* (1990) - The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions. "Transfusion" 30 (1990) 109-113.
- LEVY, C. E. (2004) - Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. 1ª edição. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004. [Acedido a: 14/05/2019]. Disponível na internet: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_microbiologia_completo.pdf
- LIGOZZI, M. *et al.* (2002) - Evaluation of the VITEK 2 System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Medically Relevant Gram-Positive Cocci. "Journal of Antimicrobial Chemotherapy" 40 (2002) 1681-1686.
- LIMA-OLIVEIRA, G. *et al.* (2015) - Laboratory diagnostics and quality of blood collection. "Journal of Medical Biochemistry" 34 (2015) 288-294.

LIPPI, G. *et al.* (2011) - Preanalytical quality improvement: from dream to reality. "Clinical Chemistry and Laboratory Medicine" 49 (2011) 1113-1126.

LIVERMORE, D. M. *et al.* (2002) - Multicentre evaluation of the VITEK 2 Advanced Expert system for interpretive reading of antimicrobial resistance tests. "Journal of Antimicrobial Chemotherapy" 49 (2002) 289-300.

LORIAN, V. (2005) - Antibiotics in Laboratory Medicine. 5ª edição. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. ISBN: 0-7817-4983-2.

MADIGAN, M. T. *et al.* (2014) - Brock Biology of Microorganisms. 14ª edição. EUA: Benjamin Cummings, 2014. ISBN: 978-0321897398.

MCLELLAN, L. K. & HUNSTAD, D. A. (2016) - Urinary Tract Infection: Pathogenesis and Outlook. "Trends in Molecular Medicine" 22 (2016) 946-957.

MERZ, W. G.; SANDFORD, G. & EVANS, G. L. (1976) - Clinical Evaluation of the Addition of Gentamicin to Commercially Prepared Mycological Media. "Journal of Clinical Microbiology" 3 (1976) 496-500.

MONEY, D. (2005) - The laboratory diagnosis of bacterial vaginosis. "Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology" 16 (2005) 77-79.

MOURA, R. DE A. *et al.* (2005) - Técnicas de Laboratório. 3ª edição. São Paulo: Atheneu, 2005. ISBN: 9788573791136.

MOYES, R. B.; REYNOLDS, J. & BREAKWELL, D. P. (2009) - Differential staining of bacteria: gram stain. "Current Protocols in Microbiology" (2009) Apêndice 3: Apêndice 3C.

MUZNY, C. A. & SCHWEBKE, J. R. (2016) - Pathogenesis of Bacterial Vaginosis: Discussion of Current Hypotheses. "The Journal of Infectious Diseases" 214 (2016) S1-S5.

NICHOLS, J. H. (2011) - Laboratory Quality Control Based on Risk Management. "Annals of Saudi Medicine" 31 (2011) 223-228.

OPENSTAX COLLEGE (2013) - Anatomy & Physiology. Houston, Texas: Rice University, 2013. [Acedido a: 19/03/2019]. Disponível na internet: <http://cnx.org/content/col11496/latest/>

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (2011) - Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus: Abbreviated Report of a WHO Consultation. Geneva: Organização Mundial da Saúde, 2011. [Acedido a: 20/04/2019]. Disponível na internet: <http://www.who.int/iris/handle/10665/70523>

- PALADINE, H. L. & DESAI, U. A. (2018) - Vaginitis: Diagnosis and Treatment Heather. "American Family Physician" 97 (2018) 321-329.
- PATTERSON, R. A.; THOMSON, T. L. & LARSAN, D. H. (1956) - The use of zephiran in the isolation of *M. tuberculosis*. "The American review of tuberculosis" 74 (1956) 284-288.
- PLEBANI, M. (2012) - Quality Indicators to Detect Pre-Analytical Errors in Laboratory Testing. "The Clinical Biochemist Reviews" 33 (2012) 85-88.
- POMPEI, R. *et al.* (1996) - A modified MacConkey medium which allows the recognition of Enterobacteriaceae from other Gram-negative bacteria on primary culture plates. "Journal of Microbiological Methods" 25 (1996) 271-278.
- POOLE, R. K. (1983) - Bacterial cytochrome oxidases. A structurally and functionally diverse group of electron-transfer proteins. "Biochimica et Biophysica Acta" 726 (1983) 205-243.
- QUAN, M. (2010) - Vaginitis: Diagnosis and Management. "Postgraduate Medical Journal" 122 (2010) 117-127.
- RAEDLER, L. A. (2014) - Diagnosis and Management of Polycythemia Vera: Proceedings from a Multidisciplinary Roundtable. "American Health & Drug Benefits" 7 (2014) S36-S47.
- RIBEIRO, A. *et al.* (2013) - Incidence of Rotavirus and Adenovirus: Detection by Molecular and Immunological Methods in Human Faeces. "Journal of Pure and Applied Microbiology" 7 (2013).
- ROLLENDER, W. *et al.* (1968) - Comparison of Xylose Lysine Deoxycholate Agar and Macconkey Agar for the Isolation of *Salmonella* and *Shigella* from Clinical Specimens. "American Journal of Clinical Pathology" 51 (1968) 284-286.
- SACKS, D. B. *et al.* (2011) - Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. "Diabetes Care" 34 (2011) 61-99.
- SANDERS, J. W. *et al.* (1994) - Evaluation of an Enzyme Immunoassay for Detection of *Chlamydia trachomatis* in Urine of Asymptomatic Men. "Journal of Clinical Microbiology" 32 (1994) 24-27.
- SANDYS, G. H. (1960) - A new method of preventing swarming of *Proteus* sp. with a description of a new medium suitable for use in routine laboratory practice. "The Journal of Medical Laboratory Technology" 17 (1960) 224-233.
- SANTOS, V. M.; CUNHA, S. F. C. & CUNHA, D. F. (2000) - Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações. "Revista da Associação Médica Brasileira" 46 (2000) 232-236.

SCHLICHT, M. J. *et al.* (2004) - High Prevalence of Genital Mycoplasmas among Sexually Active Young Adults with Urethritis or Cervicitis Symptoms in La Crosse, Wisconsin. "Journal of Clinical Microbiology" 42 (2004) 4636-4640.

SEELEY, R. R.; STEPHENS, T. D. & TATE, P. (2005) - Anatomia & Fisiologia. 6ª edição. Lisboa: Lusociência, 2005. ISBN: 972-8930-07-0.

SHEPPARD, D. C. *et al.* (2008) - Utility of the Germ Tube Test for Direct Identification of *Candida albicans* from Positive Blood Culture Bottles. "Journal of Clinical Microbiology" 46 (2008) 3508-3509.

SIMUNDIC, A.-M. *et al.* (2018) - Joint EFLM-COLABIOCLI Recommendation for venous blood sampling. "Clinical Chemistry and Laboratory Medicine" 56 (2018) 2015-2038.

STOKES, J. L. & OSBORNE, W. W. (1955) - A Selenite Brilliant Green Medium for the Isolation of *Salmonella*. "Journal of Applied Microbiology" 3 (1955) 217-220.

STUART, C. A.; STRATUM, E. V. & RUSTIGIAN, R. (1944) - Further Studies on Urease Production by *Proteus* and Related Organism. "Journal of Bacteriology" 49 (1944) 437-444.

THEML, H.; DIEM, H. & HAFERLACH, T. (2004) - Color Atlas of Hematology: Practical Microscopic and Clinical Diagnosis. 2ª edição. Nova Iorque: Thieme Flexibook, 2004. ISBN: 1-58890-193-9.

THURSBY, E. & JUGE, N. (2017) - Introduction to the human gut microbiota. "Biochemical Journal" 474 (2017) 1823-1836.

VASANTHAKUMARI, R.; JAGANNATH, K. & RAJASEKARAN, S. (1986) - A cold staining method for acid-fast bacilli. "Bulletin of the World Health Organization" 64 (1986) 741-743.

ZAPPASODI, R.; BRAUD, F. & NICOLA, M. D. (2015) - Lymphoma Immunotherapy: Current Status. "Frontiers in Immunology" 6 (2015) 448.

ZIMBRO, M. J. *et al.* (2009) - Difco™ & BBL™: Manual of Microbiological Media. 2ª edição. EUA: Becton, Dickinson and Company, 2009. ISBN: 0-9727207-1-5.

6. Anexos

6.1. Anexo I - Bioquímica, Imunologia e Endocrinologia

Tabela 18 - ADVIA® Chemistry I800, ADVIA Centaur® XP, Mini-Vidas e ImmunoCAP® 250

Aparelho	Parâmetros analíticos	Amostra(s)
ADVIA® Chemistry I800	Fator reumatoide, proteína c-reativa, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, lactato desidrogenase, albumina, fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase, anti-estreptolisina-O, colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, triglicerídeos, creatina quinase, bilirrubina total, bilirrubina direta, proteína total, transferrina, ferro, capacidade total de ligação de ferro	Soro
	Glicose, creatinina, amilase, cálcio, sódio, potássio, cloretos, fósforo inorgânico, magnésio, ureia, ácido úrico	Soro e urina
	Microalbumina, proteína total na urina	Urina
ADVIA Centaur® XP	Anti-Tg, anti-HBs, HBc total, HBsAg, HCV, HIV Ag/Ab combinado, Rub G, Rub M, Toxo G, Toxo M, estradiol, vitamina B ₁₂ , ferritina, anti-TPO, TSH, T4 livre, DHEA, IgE	Soro e plasma
	CA 19.9, CA 125, PSA livre, PSA total, T4, T3 livre, T3, FSH, LH, progesterona, testosterona, prolactina, CEA, β-hCG total, ácido fólico, alfa-fetoproteína	Soro
	Cortisol	Soro e urina
Mini-Vidas	Toxo M, CMV M, CMV G, Rub M, Rub G	Soro
	Anti-HA total, vitamina D total, HIV Duo Ultra	Soro e plasma
ImmunoCAP® 250	IgE específicos de alérgenos inalantes/atopia, IgG específicos de doenças alérgicas/pulmonares e perturbações gastrointestinais, ANA's, anti-Ro, anti-La	Soro e plasma

ANA's (Anticorpos antinucleares), **Anti-HA** (Anticorpos contra o vírus da hepatite A), **Anti-HBs** (Anticorpos contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B), **Anti-La** (Anticorpos contra o antígeno La), **Anti-Ro** (Anticorpos contra o antígeno Ro), **Anti-Tg** (Auto-anticorpos da tiroglobulina), **Anti-TPO** (Auto-anticorpos contra a peroxidase da tireóide), **β-hCG** (Gonadotropina coriônica humana), **CA 19.9** (Antígeno do cancro do cólon), **CA 125** (Glicoproteína semelhante à mucina), **CEA** (Antígeno carcinoembrionário), **CMV M** (Anticorpos de imunoglobulina M contra citomegalovírus), **CMV G** (Anticorpos de imunoglobulina G contra citomegalovírus), **DHEA** (Sulfato de dehidroepiandrosterona), **FSH** (Hormona foliculo-estimulante), **HBc** (Anticorpos contra o antígeno central do vírus da hepatite B), **HBsAg** (Antígeno de superfície do vírus da hepatite B), **HCV** (Anticorpos de imunoglobulina G contra o vírus da hepatite C), **HDL** (Lipoproteína de alta densidade), **HIV** (Vírus da imunodeficiência humana), **HIV Ag/Ab** (Antígeno p24 do HIV e anticorpos contra o tipo 1 e/ou tipo 2 do HIV), **IgE** (Anticorpos de imunoglobulina E), **IgG** (Anticorpos de imunoglobulina G), **LDL** (Lipoproteína de baixa densidade), **LH** (Hormona luteinizante), **PSA** (Antígeno específico da próstata), **Rub M** (Anticorpos de imunoglobulina M contra o vírus da rubéola), **Rub G** (Anticorpos de imunoglobulina G contra o vírus da rubéola), **T₃** (Triiodotironina), **T₄** (Tiroxina), **Toxo M** (Anticorpos de imunoglobulina M contra *Toxoplasma gondii*), **Toxo G** (Anticorpos de imunoglobulina G contra *Toxoplasma gondii*) e **TSH** (Hormona estimulante da tireóide).

Nota: HIV Duo Ultra permite a detecção combinada das imunoglobulinas totais anti-HIV-1, anti-HIV-2 e anti-antígeno p24 de HIV-1.

6.2. Anexo II - Serologia

Tabela 19 - Técnicas manuais de Serologia

	Kit	Comentários
VDRL	Axis-Shield (teste de aglutinação)	Screening de sífilis (A.E.: <i>Treponema pallidum</i>)
TPHA	SD Bioline Syphilis 3.0® (teste imunocromatográfico em cassete)	
Waalser-Rose	Avitex® Rose Waaler (teste de aglutinação)	Deteção do fator reumatoide
Paul Bunnel	Avitex® IM (teste de aglutinação)	Screening de Mononucleose Infeciosa (A.E.: Vírus <i>Epstein-Barr</i>)
Wright	Spinreact (teste de aglutinação)	Deteção de anticorpos anti- <i>Salmonella</i> , anti- <i>Brucella</i> , anti- <i>Rickettsia</i>
Widal	Spinreact (teste de aglutinação)	Deteção de anticorpos anti- <i>Salmonella</i> , anti- <i>Brucella</i> , anti- <i>Proteus</i>
Weil-Felix	Micropath® Antigenis (teste de aglutinação)	Deteção de anticorpos produzidos por várias bactérias patogénicas
ANA's	HEp-20-10 Euroimmun (teste de imunofluorescência indireta)	Deteção de autoanticorpos contra núcleos celulares
Coombs	ID Micro Typing System DiaMed (técnica de microtubo em gel)	Pesquisa de aloanticorpos

A.E. (Agente etiológico), **ANA's** (Anticorpos antinucleares), **TPHA** (*Treponema Pallidum Particle Agglutination Assay*), **VDRL** (*Venereal Disease Research Laboratory*).

6.3. Anexo III - Esfregaço sanguíneo (Critérios)

Tabela 20 - Critérios para a observação de esfregaço de sangue periférico (DGS vs LACSL)

Parâmetros	Norma DGS (12/09/2013)	LACSL	Valores críticos DGS	LACSL
Hemoglobina (g/dl)	Valor mínimo <7; Valor máximo: 2g/dl acima do valor de referência: 0-6 meses: 11,0-18,0; 6 meses-11 anos: 11,0-14,0; Homem >11 anos: 13,6-18,0; Mulher >11 anos: 11,5-16,0	<7,0...>19,9	0-6 meses: <10,0 ou >19,9; Restantes idades: <6,0	0-6 meses: <10,0 ou >19,9; Restantes idades: <8,0...>19,9
Hematócrito (%)	-	-	0 a 2 semanas: <30,0...>61,0; Restantes idades: <18,0...>61,0	<18,0...>61,0
VGM (fl)	<75...>105	<75...>105; Crianças: <65	Não existe	Não existe
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	<100...>1000	<100...>1000	0-2 meses: <100...>1000; Restantes idades: <25...>1000	0-2 meses: <100...>1000; Restantes idades: <25...>1000

Tabela 20 - Continuação

Parâmetros	Norma DGS (12/09/2013)	LACSL	Valores críticos DGS	LACSL
Leucócitos ($\times 10^9/L$)	<4,0...>30,0	<4,0...>30,0	<1,0...>30,0	<1,0...>30,0
Neutrófilos ($\times 10^9/L$)	<1,0...>20,0	<4,0...>20,0	<0,50	<0,50
Linfócitos ($\times 10^9/L$)	...>7	...>7	Não existe	Não existe
Monócitos ($\times 10^9/L$)	...>1,5	...>1,5	Não existe	Não existe
Eosinófilos ($\times 10^9/L$)	...>2,0	...>2,0	Não existe	Não existe
Basófilos ($\times 10^9/L$)	...>0,05	...>0,05	Não existe	Não existe
Outros alarmes	Não existe	Análise de histogramas em função de idade, sexo histórico, gravidez, outros resultados	Células leucémicas, parasitas e células falciformes	Células leucémicas, parasitas e células falciformes
INR	Não existe	Não existe	Não existe	>4,5
APTT (*)	Não existe	Não existe	Não existe	>75

APTT (Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada), **DGS** (Direção-Geral da Saúde); **INR** (Razão Internacional Normalizada); **LACSL** (Laboratório de Análises Clínicas São Lázaro).

6.4. Anexo IV - Coloração de esfregaço de sangue periférico

Tabela 21 - Kit Hemacolor®

Reagentes (Millipore)		Tempo de imersão
Solução 1	Metanol (solução de fixação)	10'
Solução 2	Eosina Y (reagente de coloração vermelho)	3 x 1"
Solução 3	Azure B (reagente de coloração azul)	6 x 1"
Solução 4	Solução Buffer (pH 7,2)	2 x 10"

Procedimento:

a. Realização do esfregaço sanguíneo (Figura 10):

1. Utilizar lâminas limpas e livres de gordura;
2. Homogeneizar a amostra de sangue total;
3. Colocar uma gota de sangue numa das extremidades da lâmina;
4. Aplicar uma segunda lâmina, num ângulo de 25 a 30 graus, junto da gota de sangue;
5. Assim que o sangue se espalhar ao longo da borda da lâmina, avançar com a mesma num movimento suave e estável (para se obter um esfregaço fino);
6. Deixar a lâmina secar à temperatura ambiente.

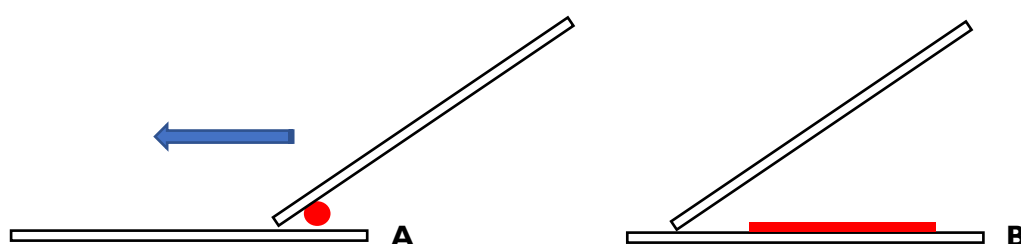


Figura 10 - Técnica para a realização de um esfregaço de sangue periférico.

b. Coloração do esfregaço:

Após a secagem e fixação do esfregaço, a coloração é feita através da imersão da lâmina nas soluções de eosina e azul de metileno do *kit Hemacolor*[®] (**Tabela 21**). Ter o cuidado de limpar o excesso de reagente na passagem da lâmina entre as soluções (1 a 4). Na **Tabela 22** estão disponíveis os resultados da coloração pelo *kit Hemacolor*[®].

Tabela 22 - Coloração de esfregaço sanguíneo pelo *kit Hemacolor*[®]

Elementos figurados	Coloração
Eritrócitos	Vermelho
Linfócitos	Citoplasma azul acinzentado e grânulos violeta ou rosa-púrpura
Monócitos	Citoplasma principalmente azul
Neutrófilos	Grânulos violeta claro
Eosinófilos	Grânulos vermelho a vermelho-acastanhado
Basófilos	Grânulos violeta escuro a preto
Plaquetas	Violeta

6.5. Anexo V – Coloração de Gram

Tabela 23 - Reagentes da coloração de Gram

	Reagentes (bioMérieux)	Tempo (minutos)
Solução 1	Cristal violeta	1
Solução 2	Solução de lugol	1
Solução 3	Álcool-acetona (diferenciador)	1
Solução 4	Safranina (corante de contraste)	1

Procedimento:

a. Realização do esfregaço e sua fixação:

1. Utilizar lâminas rigorosamente limpas;
2. No centro da lâmina colocar uma porção do produto biológico ou da cultura;
3. Executar o espalhamento cuidadosamente, com pequenos movimentos circulares e centrífugos, até ao seu esgotamento;
4. Em caso de materiais poucos fluídos, em primeiro lugar, colocar no centro da lâmina uma gota de água destilada e, de seguida, uma porção da amostra sobre essa mesma gota. Fazer uma emulsão e depois o espalhamento do material;
5. Fixar o esfregaço pelo calor, através de passagens rápidas e com uma certa cadência (3 a 4 vezes) pela chama.

b. Coloração (Tabela 23):

1. Deixar a lâmina arrefecer, após a execução e fixação do esfregaço;
2. Cobrir a lâmina com **cristal violeta**, durante 1';
3. Lavar suavemente com água (não exceder os 5");
4. Cobrir a lâmina com **lugol**, durante 1';
5. Lavar com água;
6. Descorar com **álcool-acetona**. Deixar em contacto 1';
7. Lavar e escorrer o excesso de água;
8. Cobrir a lâmina com **safranina**, durante 1';
9. Lavar, escorrer e limpar o excesso de água;
10. Deixar a lâmina a secar à temperatura ambiente;
11. Finalmente observar o esfregaço com a objetiva de imersão.

6.6. Anexo VI - Coloração de Bacilos Ácido-Álcool Resistentes (KINYOUN)

Tabela 24 - Reagentes da coloração de Kinyoun

Reagentes (biolab)		Tempo (minutos)
Solução 1	Carbolfucsina (fucsina básica e fenol)	5
Solução 2	Ácido sulfúrico e álcool etílico (solução descolorante)	3
Solução 3	Azul de metileno (corante de contraste)	1

Procedimento:

a. Realização do esfregaço e sua fixação:

1. Utilizar lâminas rigorosamente limpas;
2. No centro da lâmina colocar uma porção do produto biológico ou da cultura;
3. Executar o espalhamento cuidadosamente, com pequenos movimentos circulares e centrífugos, até ao seu esgotamento;
4. Em caso de materiais poucos fluídos, em primeiro lugar, colocar no centro da lâmina uma gota de água destilada e, de seguida, uma porção da amostra sobre essa mesma gota. Fazer uma emulsão e depois o espalhamento do material;
5. Fixar o esfregaço pelo calor, através de passagens rápidas e com uma certa cadência (3 a 4 vezes) pela chama.

b. Coloração (Tabela 24):

1. Após a realização e fixação do esfregaço, deixar a lâmina arrefecer;
2. Cobrir a lâmina com **solução de carbol-fucsina**, durante 5’;
3. Remover o excesso de corante com álcool etílico 96%;
4. Lavar abundantemente a preparação com água destilada;
5. Cobrir a lâmina com a **solução descolorante**, durante 3’;
6. Lavar abundantemente com água destilada;
7. Aplicar a **solução de contraste**, durante 1’;
8. Lavar a preparação com água corrente;
9. Terminar a secagem à temperatura ambiente e observar a lâmina com a objetiva de imersão.