



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Ana Sofia Vaz Rodrigues

## Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Celeste Lopes e pela Dra. Iolanda Rodrigues e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2019



Ana Sofia Vaz Rodrigues

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO**  
**MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS**

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Celeste Lopes e pela Dra. Iolanda Rodrigues apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2019



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA



## **Agradecimentos**

Terminada esta etapa tão importante da minha vida, quero agradecer a todos aqueles que me acompanharam durante todo o meu percurso e que de alguma forma contribuíram para que fosse possível chegar aqui.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Professora Doutora Celeste Lopes, minha orientadora interna, por toda a disponibilidade e ajuda na concretização deste trabalho.

À Dra. Iolanda Rodrigues, Farmacêutica Especialista em Análises Clínicas, por me ter recebido no Laboratório Fernão Magalhães e por toda a disponibilidade e conhecimento que demonstrou ao longo destes meses.

A toda a equipa técnica do Laboratório Fernão Magalhães, por toda a simpatia, paciência e tempo disponibilizado para me transmitirem um pouco dos vossos conhecimentos. Permitiram que fosse uma grande experiência.

À Ana, à Kátia, ao Diogo, à Inês, à Marília, à Maria, ao Marco, à Joana, ao Andorinha e à Bia, por todos os momentos que partilhamos, por toda a paciência e por todo o carinho. São sem dúvida muito especiais. Obrigada por tudo!

Por último, mas os mais importantes, quero agradecer a toda a minha família, em especial aos meus pais e ao meu irmão, por todos os conselhos dados. Por todo carinho, apoio e por me terem ensinado que nada se consegue sem esforço. Um grande obrigada do fundo do coração!



## Índice

Índice de Figuras.....	i
Índice de Tabelas.....	iii
Abreviaturas e Siglas.....	v
Resumo.....	vii
1. Introdução.....	1
2. Caracterização do Laboratório.....	2
3. Atividades Desenvolvidas.....	3
4. Fase Pré-Analítica.....	4
5. Fase Analítica.....	6
6. Microbiologia.....	7
6.1. Coloração de Gram.....	8
6.2. Coloração de Kinyoun.....	9
6.3. Meios de Cultura.....	10
6.4. Produtos Biológicos.....	12
6.4.1. Urina.....	13
6.4.2. Fezes.....	15
6.4.3. Expetoração.....	18
6.4.4. Exsudado Vaginal ou Uretral.....	19
6.4.4.1. Pesquisa de <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	20
6.4.5. Sangue.....	21
6.5. Identificação de microrganismos.....	21
6.5.1. Testes Manuais.....	23
6.5.1.1. Teste da Catalase.....	23
6.5.1.2. Teste da Coagulase.....	23
6.6. Suscetibilidade Antimicrobiano.....	23
6.7. Serologia Infeciosa.....	24
6.7.1. Venereal Disease Research Laboratory (VDRL).....	24
6.8. Diagnóstico Viral.....	25
7. Hematologia.....	25
7.1. Hematopoiese.....	26
7.2. Hemograma.....	28
7.2.1. Eritrócitos.....	28

7.2.2. Hemoglobina .....	29
7.2.3. Hematócrito .....	29
7.2.4. Volume Globular Médio .....	30
7.2.5. Hemoglobina Globular Média.....	30
7.2.6. Concentração Hemoglobina Globular Média .....	30
7.2.7. Distribuição do Diâmetro dos Eritrócitos (RDW) .....	31
7.2.8. Contagem Diferencial de Leucócitos.....	31
7.2.9. Plaquetas.....	36
7.3. Contagem de Reticulócitos .....	37
7.4. Esfregaço de Sangue Periférico .....	37
7.5. Anemias.....	38
7.5.1. Anemia microcítica e hipocrômica.....	39
7.5.2. Anemia Macrocítica .....	40
7.5.3. Anemia Hemolítica.....	41
7.5.4. Anemia Normocítica .....	41
7.6. Provas de Hemostase .....	42
7.6.1. Tempo de Protrombina e INR.....	43
7.6.2. Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativado .....	43
7.7. Velocidade de Sedimentação.....	44
7.8. Determinação do Grupo Sanguíneo.....	45
8. Fase Pós- Analítica.....	46
9. Controlo de Qualidade Externo.....	47
10. Conclusão .....	47
11. Bibliografia .....	49
Anexos .....	55



## Índice de Figuras

Figura 1- Recipiente de recolha de amostra de urina. Fotografia Laboratório Fernão Magalhães.....	6
Figura 2- Recipiente de recolha de amostra de fezes. Fotografia Laboratório Fernão Magalhães.....	6
Figura 3- Composição da parede das Bactérias Gram Positivo (A) e Gram Negativo (B) .....	8
Figura 4- Parede das Bactérias Ácido- Álcool Resistentes.....	9
Figura 5- Observação macroscópica de colónias presuntivas de <i>Eschericia coli</i> (Fotografia Laboratório Fernão Magalhães).....	14
Figura6- Observação macroscópica de colónias suspeitas de <i>Proteus spp</i> (Fotografia Laboratório Fernão Magalhães).....	14
Figura 7- Observação macroscópica de colónias suspeitas de <i>Enterococcus spp</i> (Fotografia Fernão Magalhães) .....	14
Figura 8- Observação macroscópica de colónias características de <i>Candida albicans</i> (Fotografia Laboratório Fernão Magalhães).....	15
Figura 9- Observação de células epiteliais de transição e alguns cristais de oxalato de cálcio num sedimento urinário (Fotografia Laboratório Fernão Magalhães) .....	15
Figura 10- Observação macroscópica de colónias características de <i>Campylobacter spp</i> numa amostra de fezes (Fotografia Laboratório Fernão Magalhães).. .....	17
Figura 11- Preparação de um esfregaço por técnica de estiramento .....	18
Figura 12- Observação macroscópica de colónias típicas de <i>Haemophilus influenzae</i> (Fotografia Laboratório Fernão Magalhães).....	19
Figura 13- Histograma normal da contagem de eritrócitos.....	26
Figura 14- Hematopoiese. A hematopoiese inicia-se com a célula hematopoiética (HSC). A célula hematopoiética pode dar origem a novas células ou autorrenovar-se. CMP (célula progenitora mieloide); CLP (célula progenitora linfoide); EP (precursor dos eritrócitos); MK (megacariócito); GM (precursor dos macrófagos granulócitos); BCP (célula precursora das células B) TNK (célula precursora das células NK e T); GP (precursor dos granulócitos) e MP (precursor dos macrófagos).....	27
Figura 15- Observação microscópica de neutrófilos num esfregaço de sangue periférico após coloração de May Grunwald Giemsa (objetiva 100x) (Fotografia Laboratório Fernão Magalhães) .....	32
Figura 16- Observação microscópica de eosinófilos num esfregaço de sangue periférico após coloração de May Grunwald Giemsa (objetiva 100x).. .....	33

Figura 17- Observação microscópica de basófilos num esfregaço de sangue periférico após coloração de May Grunwald Giemsa (objetiva 100x).....	33
Figura 18- Observação microscópica de monócitos num esfregaço de sangue periférico após coloração de May Grunwald Giemsa (objetiva 100x).....	34
Figura 19- Observação microscópica de linfócitos num esfregaço de sangue periférico após coloração de May Grunwald Giemsa (objetiva 100x).....	35
Figura 20- Observação microscópica de plaquetas (A) e agregados plaquetários (B) num esfregaço de sangue periférico após coloração de May Grunwald Giemsa (objetiva 40x). (Fotografia Laboratório Fernão Magalhães).....	36
Figura 21- Observação microscópica de um esfregaço de sangue periférico que contém um eritroblasto, após coloração de May Grunwald Giemsa (objetiva 100x) (Fotografia Laboratório Fernão Magalhães).....	38
Figura 22- Modelo de Cascata de Coagulação.....	44
Figura 23- Cartas do kit para a determinação do grupo sanguíneo compostas por microtúbulos.....	46

## **Índice de Tabelas**

Tabela 1-Tubos mais utilizados para colheita de sangue. Composição e utilização .....	5
Tabela 2- Microrganismos mais comuns na flora comensal e microrganismos potencialmente patogénicos no Homem .....	12
Tabela 3- Classificação de amostras de expetoração segundo Murray e Washington .....	19
Tabela 4- Cartas utilizadas para avaliar a suscetibilidade dos antimicrobianos.....	24
Tabela 5- Classificação da anemia .....	39
Tabela 6- Interpretação do Grupo AB0 .....	46
Tabela 7- Interpretação do Grupo Rh .....	46



## Abreviaturas e Siglas

AEFA	Associação Espanhola de Farmacêuticos Analíticos
aPPT	Tempo de tromboplastina parcialmente ativada, do inglês “ <i>Activated Partial Thromboplastin Time</i> ”
ATP	Adenosina Trifosfato
CAN	Gelose Chrom ID Candida
Células NK	Do inglês “ <i>Natural Killer Cells</i> ”
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CMV	Citomegalovírus
CNA	Gelose Columbia CNA Agar com 5% de sangue de ovelha
CPS	Gelose Chrom ID CPS Elite
DGS	Direção Geral da Saúde
EBV	Vírus Epstein Barr, do inglês “ <i>Epstein-Barr virus</i> ”
ESP	Esfregaço de Sangue Periférico
FI	Fator Intrínseco
GV	Glóbulo Vermelho
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês “ <i>Human Immunodeficiency virus</i> ”
Ht	Hematócrito
IL 13	Interleucina 13
IL 4	Interleucina 4
INR	Razão internacional normalizada, do inglês “ <i>International Normalized Ratio</i> ”
KESC	Espécies dos géneros <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> e <i>Citrobacter</i>
MAC	Mestrado em Análises Clínicas
NEQAS	Programa de controlo de qualidade externo, do inglês “ <i>United Kingdom External Quality Assessment Schemes</i> ”
PDW	Dispersão de volume plaquetar, do inglês “ <i>Plaquets Distribution Width</i> ”
PVX	Gelose Chocolate PolyVitex

RDW	Dispersão de volume eritrocitário, do inglês “ <i>Red-cells Distribution Width</i> ”
RIQAS	Programa de controlo de qualidade externo, do inglês “ <i>Randox International Quality Assessment Scheme</i> ”
RNA	Ácido Ribonucleico, do inglês “ <i>Ribonucleic acid</i> ”
TP	Tempo de Protrombina
TSA	Teste Sensibilidade a Antibióticos
VCM	Volume Corpuscular Médio
VDRL	Laboratório de pesquisa de doenças venéreas, do inglês “ <i>Venereal Disease Research Laboratory</i> ”
WBC	Glóbulos brancos, do inglês “ <i>White Blood Cells</i> ”

## **Resumo**

O presente relatório tem como objetivo descrever de forma sucinta as atividades desenvolvidas durante o estágio curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. O estágio decorreu entre os meses de fevereiro a julho no Laboratório Fernão Magalhães, em Vila Nova de Gaia.

O relatório aborda em particular as valências de Microbiologia e Hematologia, onde são referidos os diferentes exames realizados, os equipamentos e as respetivas metodologias utilizadas, interpretação e validação dos resultados. É descrito ainda, de uma forma sucinta, o processo de controlo de qualidade que permite garantir a qualidade dos resultados obtidos.

**Palavras-Chave:** Análises Clínicas, Diagnóstico, Hematologia, Microbiologia, Saúde.

## **Abstract**

This report aims to describe the activities developed during the Faculty of Pharmacy of University of Coimbra Master's degree of Clinical Analysis internship. The internship went from February to July on the Fernão Magalhães Laboratory in Vila Nova de Gaia.

The report covers the areas of Microbiology and Haematology where it explains the methodologies used in the laboratory, as well as the criteria applied in the interpretation and validation of analytical results. It also briefly describes the quality control process that allows the laboratory to ensure the reliability of the results obtained

**Keywords:** Clinical Analysis, Diagnostic, Haematology, Health, Microbiology.





## **I. Introdução**

As análises clínicas são um dos mais importantes meios de diagnóstico complementares uma vez que permitem, através da recolha de materiais biológicos, diagnosticar anomalias, patologias ou doenças de maior ou menor gravidade colaborando ainda para a sua prevenção e deteção precoce.

A garantia dos serviços prestados por um laboratório de Análises Clínicas é da responsabilidade dos profissionais de saúde. É importante que existam profissionais qualificados para que os métodos utilizados, a interpretação e a validação dos resultados obtidos sejam realizados de forma correta.

O estágio curricular do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra tem como objetivo permitir aos alunos a iniciação profissional em contexto real de trabalho, através da passagem pelas principais valências: Bioquímica Clínica, Imunologia/Endocrinologia, Hematologia e Microbiologia. Assim permite a aquisição de competências práticas, nomeadamente a nível das técnicas e equipamentos utilizados, bem como aplicar os conhecimentos teóricos adquiridos durante a formação curricular.

Este relatório é uma breve descrição do meu estágio curricular realizado no Laboratório Fernão Magalhães, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas com especial destaque nas valências de Microbiologia e Hematologia.

## **2. Caracterização do Laboratório**

O Laboratório de Análises Clínicas Fernão Magalhães é uma das quatro unidades laboratoriais pertencentes ao Grupo *Affidea* Portugal, e que está ao serviço da comunidade há mais de 40 anos, sendo um laboratório devidamente certificado pelas Normas de Laboratório Clínico da Ordem dos Farmacêuticos e pela Norma NP EN ISO 9001. O Laboratório Central situa-se em Vila Nova de Gaia e possui vários postos de colheitas na zona Metropolitana do Porto e nos concelhos vizinhos. Para além do serviço à comunidade local possui acordos com várias entidades da área da saúde como empresas de Medicina de Trabalho, clínicas de diagnóstico, lares e Centros de Hemodiálise. Também disponibiliza o serviço de colheita de amostras biológicas ao domicílio. O laboratório tem em média 150 utentes por dia. A equipa é constituída por vários Técnicos de Análises Clínicas e por dois Técnicos Superiores de Saúde sendo a responsabilidade técnica da competência da Dra. Iolanda Rodrigues, Farmacêutica Especialista em Análises Clínicas e Genética Humana pelo Colégio de Especialidade da Ordem dos Farmacêuticos.

O laboratório central é constituído por três grandes áreas: receção e atendimento aos utentes (zona de colheitas de produtos biológicos), área administrativa e área laboratorial. A área laboratorial é constituída por quatro setores: Bioquímica, Imunologia/Endocrinologia, Hematologia e Microbiologia. O laboratório é automatizado sendo a maioria dos parâmetros analíticos realizados em equipamentos devidamente certificados, calibrados e controlados por controlos internos devidamente certificados pelos fabricantes e através da participação em programas de Avaliação Externa da Qualidade Laboratorial nacionais e internacionais.

### **3. Atividades Desenvolvidas**

No Laboratório Fernão Magalhães tive a oportunidade de passar por todas as áreas: Bioquímica Clínica, Imunologia/Endocrinologia, Hematologia e Microbiologia. Como já referido anteriormente, as áreas que vão ser desenvolvidas neste relatório serão Microbiologia e Hematologia.

A área de Imunologia/endocrinologia é uma área bastante automatizada. Foi possível realizar a deteção/doseamento de diversos parâmetros, nomeadamente hormonas (Progesterona, Testosterona, Estradiol, Hormona Folículo-Estimulante, Hormona Lúteo-Estimulante, Prolactina), marcadores tumorais (Ca 19-9, Ca 125, Alfa-Fetoproteína, Antígeno Carcinoembrionário, Antígeno específico da próstata nas frações total e livre) e marcadores virais (Antígeno de superfície do Vírus da Hepatite B, entre outros).

Na área de Bioquímica acompanhei as determinações de Glucose, Albumina, Bilirrubina total, Bilirrubina direta, Cálcio, Colesterol total, Colesterol HDL, Colesterol LDL, Triglicéridos, Creatinina, Lactato desidrogenase, Ferro, Magnésio, Fosfato, Proteínas totais, Ureia, Ácido úrico, Gama GT, Fosfatase alcalina, Ionograma, Hemoglobina glicada, Proteinograma. Todas estas determinações são feitas a partir de métodos automatizados. Nesta área também é realizada a parte de serologia infecciosa.

#### 4. Fase Pré-Analítica

As Análises Clínicas são o principal método auxiliar de diagnóstico e a monitorização terapêutica. Os principais deveres de um laboratório clínico são garantir a qualidade dos resultados laboratoriais, melhorar a qualidade dos serviços prestados, assegurando a garantia da qualidade durante todas as fases do processo analítico: fase pré-analítica, fase analítica e fase pós-analítica (Instituto Português de Acreditação).

A fase pré-analítica ocorre desde o momento de prescrição por parte do médico até ao processamento da amostra e é um processo fundamental na atividade e qualidade do laboratório clínico.

Devido à dificuldade de comunicação com os utentes e clínicos, dispersão geográfica dos postos de colheitas, diversidade dos profissionais do laboratório e dos diferentes procedimentos na preparação do utente, na colheita, no tratamento e transporte das amostras biológicas, é nesta fase que pode ocorrer o maior número de erros laboratoriais. O cuidado na realização dos procedimentos da colheita, armazenamento e transporte da amostra tem relação direta com a qualidade do resultado fornecido pelo laboratório (Ordem dos Farmacêuticos e Associação Portuguesa de Analistas Clínicos).

Na colheita de produtos biológicos existem certas amostras que podem ser colhidas pelo utente, como por exemplo amostras de urina e fezes. Posto isto é necessário explicar da melhor forma possível a maneira correta como o utente deve colher as devidas amostras. No caso da amostra de urina existem vários procedimentos de colheita, mas geralmente o mais pedido é a recolha da primeira urina da manhã. Sendo assim, é necessário explicar ao utente todos os passos necessários para uma boa colheita de amostra. A higiene íntima deve ser feita em primeiro lugar, posto isto, desperdiçar o primeiro jato e recolher o jato intermédio. Quanto à colheita de amostras de fezes é importante referir que são necessárias três amostras de três dias consecutivos e a recolha é feita para o recipiente estéril entregue no laboratório. O tamanho da amostra não deve ser maior que o tamanho de uma azeitona.

A colheita realizada no laboratório por profissionais de saúde deve ser feita num local adequado e com o mínimo risco possível de contaminação com agentes patogénicos. Nas colheitas de sangue deve ter-se sempre em conta os exames requisitados, pois consoante o tipo de análise o tubo de recolha é diferente (Tabela 1) (Dhingra *et al.*, 2009).

**Tabela 1- Tubos mais utilizados para colheita de sangue. Composição e utilização (Dhingra *et al.*, 2009).**

<b>Tubo de Colheita</b>	<b>Anticoagulante</b>	<b>Análise</b>
	Citrato de Sódio	Provas de Hemóstase Requer plasma
	EDTA	Hemograma, Velocidade de Sedimentação e HbA <sub>1c</sub> Requer sangue total
	Sem anticoagulante	Bioquímica (colesterol, glicose, ureia, creatinina) Imunologia (deteção de anticorpos e antigénios). Após centrifugação obtém-se soro
	Sem anticoagulante	Absorção Atómica (deteção de metais)



**Figura 2- Recipiente de recolha de amostra de urina (Fotografia Laboratório Fernão Magalhães).**



**Figura 1- Recipiente de recolha de amostra de fezes (Fotografia Laboratório Fernão Magalhães).**

## **5. Fase Analítica**

Após a colheita e preparação da amostra inicia-se o processo analítico.

A fase inicial do processo analítico é o controlo e calibração dos equipamentos e técnicas implementadas no laboratório - Sistema de Controlo de Qualidade Interno. No início de cada dia de trabalho é feita a avaliação do funcionamento dos equipamentos automatizados através de amostras de valores já conhecidos (controlos internos) fornecidos pelo fabricante e se necessário a calibração das técnicas (algumas técnicas exigem a calibração diária e outras apenas quando se procede a mudança de lote). A análise dos resultados obtidos é feita com recurso ao programa *Unity Real Time*, que fornece ao técnico as cartas de controlo, fazendo o estudo comparativo com os valores de referência e interlaboratórios.

A implementação deste sistema de Controlo de Qualidade é muito importante de maneira a assegurar um funcionamento de excelência dos procedimentos laboratoriais, garantindo a repetibilidade e uniformidade dos resultados obtidos.

## 6. Microbiologia

O sector de Microbiologia tem um importante papel de diagnóstico e controlo de doenças infecciosas. A maioria dos testes de diagnóstico utilizados baseiam-se na capacidade de crescimento do microrganismo nos diversos meios de cultura utilizados (Murray e Rosenthal, 2014).

São solicitadas em vários tipos de amostras biológicas a pesquisa e identificação de agentes patogénicos: bactérias, parasitas e fungos, e testes de suscetibilidade aos antimicrobianos isolados para orientação do tratamento.

Esta é uma das áreas do laboratório menos automatizada, dependendo muito do conhecimento e especialização dos técnicos que lá trabalham. Contudo nos últimos anos tem ocorrido uma automatização na área dos testes de suscetibilidade aos antibióticos. As técnicas utilizadas para o diagnóstico etiológico das infeções dependem em grande parte das características bioquímicas dos microrganismos que se pretende identificar. Assim o diagnóstico é feito mediante o exame cultural e o exame microscópico da amostra biológica. O exame cultural permite isolar as espécies bacterianas presentes na amostra e que podem ser responsáveis pela infeção, sendo posteriormente realizado a identificação e TSA - sensibilidade a antibióticos. Para se efetuar o estudo microbiológico adequado é fundamental conhecer a flora saprófita do respetivo produto biológico, bem como quais os microrganismos habitualmente responsáveis por infeções, diferenciar culturas puras e quantitativamente significativas, de culturas mistas, resultado de contaminação ou não valorizáveis por outros fatores. É também muito importante haver uma adequada colheita, transporte e armazenamento da amostra para assim se obter resultados de confiança (Murray e Rosenthal, 2014).

## 6.1. Coloração de Gram

A coloração de Gram é a coloração mais utilizada num laboratório de microbiologia. É uma coloração diferencial, pois permite a separação dos dois principais grupos de bactérias (bactérias de Gram positivo e bactérias de Gram negativo) com base na sua capacidade de retenção dos dois corantes utilizados. Após a fixação do material biológico na lâmina esta é exposta ao corante de violeta de genciana e ao soluto de lugol (que permite aumentar a afinidade do primeiro corante para a bactéria e torna a coloração mais rápida e mais estável). Durante a descoloração com álcool-acetona o complexo anterior é mantido nas bactérias de Gram positivo e é eliminado nas bactérias de Gram negativo, utilizando-se assim um segundo corante, designado fucsina de Ziehl ou um outro designado safranina que é retido por estas bactérias (Mahon e Lehman, 2018).

O grau com que o microrganismo retém a coloração está relacionado com a natureza química da parede celular bacteriana. Esta é uma estrutura semirrígida responsável pela forma e integridade da bactéria, constituída por uma macromolécula designada peptidoglicano. Esta macromolécula constitui 50 a 70% do peso seco da parede celular das bactérias de Gram positivo. Nas bactérias de Gram negativo constitui apenas cerca de 5 a 10% do peso seco da parede celular. Estas bactérias para além desta camada fina de peptidoglicano ainda são constituídas por uma membrana externa sobreposta (Mahon e Lehman, 2018).

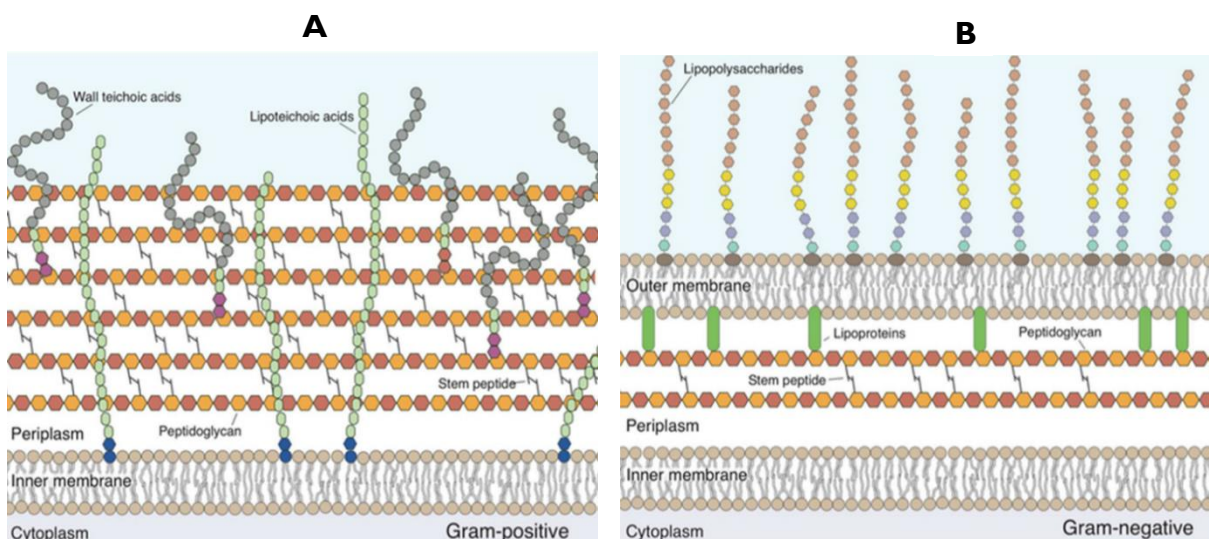


Figura 3- Composição da parede das Bactérias Gram Positivo (A) e Gram Negativo (B) (Allison, 2011).



A observação do esfregaço corado é feita ao microscópio (objetiva de 100x) e possibilita também diferenciar as bactérias em cocos e bacilos, tendo em conta a sua forma mais redonda ou alongada, respetivamente, e se adotam algum tipo de agrupamento (pares, em cacho, em cadeia, etc.) – características importantes na sua identificação.

## 6.2. Coloração de Kinyoun

A coloração de Kinyoun é utilizada para corar microrganismos álcool-ácido-resistentes. Na parede celular destes microrganismos estão predominantemente presentes ácidos micólicos de cadeia longa e ácidos gordos ramificados, o motivo pelo qual requerem uma coloração diferente da coloração de Gram (Murray e Rosenthal, 2014).

O procedimento desta coloração é idêntico à coloração de Ziehl-Neelsen, a única diferença é que é feito a frio, não requer aquecimento do material. Os microrganismos são corados com fucsina básica e resistem à descoloração com soluções ácido-alcalinas.

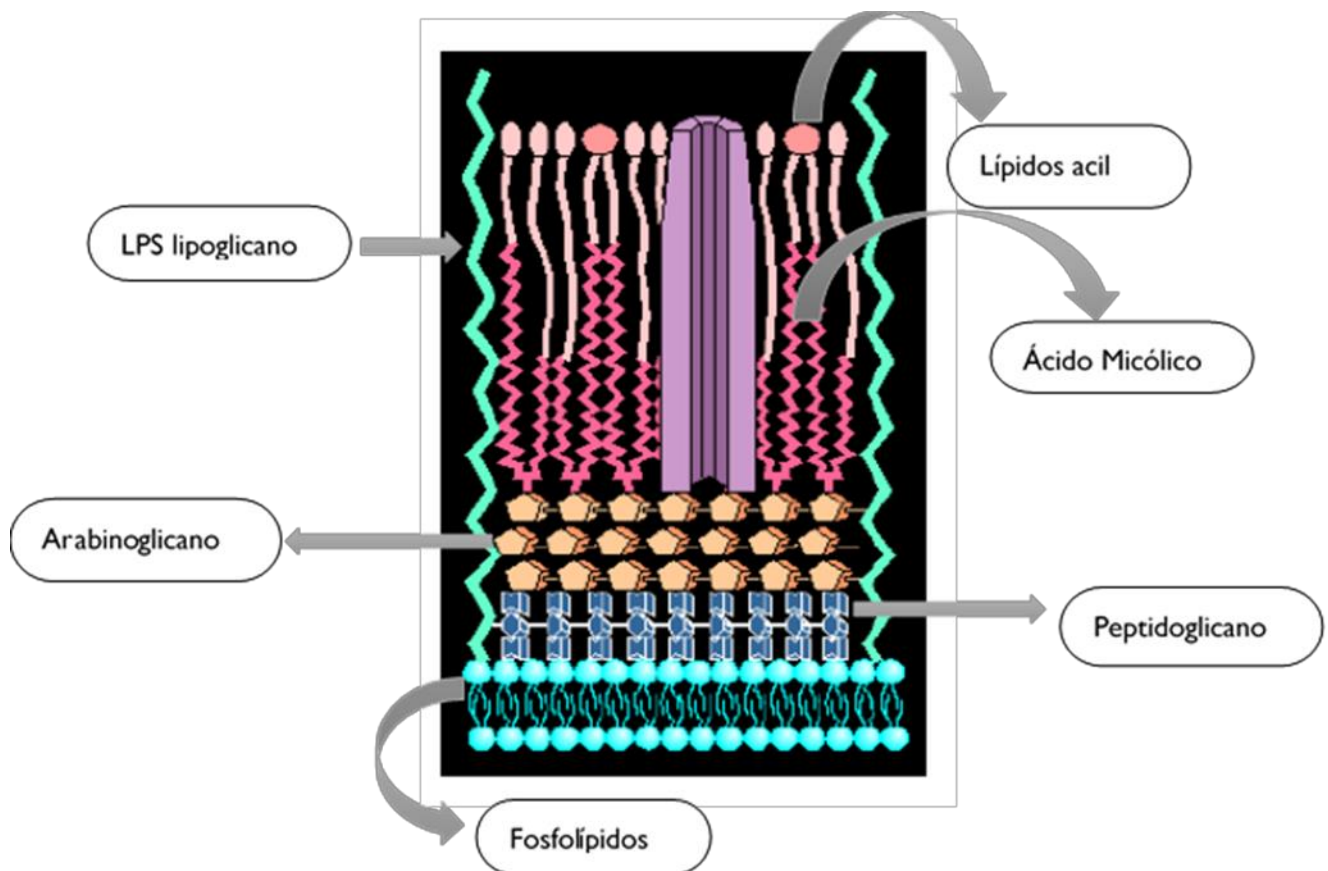


Figura 4- Parede das Bactérias Ácido- Álcool Resistentes.

A observação do esfregaço também é feita ao microscópio (objetiva de 100x) e permite ver o fundo corado com azul de metileno e os microrganismos corados de vermelho.

### 6.3. Meios de Cultura

O estudo microscópico das características morfológicas e das características de coloração é insuficiente para a obtenção de uma identificação fiável do agente patogénico. Para completar a análise microbiológica é necessário realizar a cultura dos produtos biológicos para verificar se ocorre crescimento de bactérias e analisar as propriedades fisiológicas e bioquímicas.

Um meio de cultura é um substrato nutritivo capaz de proporcionar o alimento e o crescimento dos microrganismos fora do seu ambiente natural. Para além das necessidades nutricionais é importante proporcionar condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento, tais como temperatura de incubação, pH, pressão osmótica, humidade e atmosfera (aeróbia, microaerofílica ou anaeróbia). Os meios podem dividir-se de acordo com o seu estado físico em líquidos, sólidos e semi-sólidos. Em relação ao seu objetivo dividem-se em meios seletivos, diferenciais ou de enriquecimento. Os meios seletivos são usados para isolar um grupo específico de microrganismos pois são aditivados com antibióticos para suprimir o crescimento de outros microrganismos diferentes dos que são suspeitos de estar a causar infeção. Os meios diferenciais permitem separar grupos de microrganismos através da sua aparência no meio. Da sua constituição fazem parte substâncias químicas (indicadores) que após a incubação mostram alterações na aparência do crescimento microbiano e/ou no meio que rodeia as colónias o que permite a sua diferenciação e identificação. Dão informação sobre o metabolismo do microrganismo. Os meios de enriquecimento são usados para a cultura de microrganismos exigentes, têm necessidades nutricionais específicas, não crescem ou têm dificuldade em crescer em meios básicos e por isso requerem a adição de fatores de crescimento (Fonseca *et al.*, 2004).

No laboratório Fernão Magalhães os meios de cultura com os quais contactei durante o período de estágio foram:

**Gelose de chocolate + PolyVitex:** é um meio de isolamento que se destina particularmente ao crescimento de microrganismos mais exigentes, como por exemplo *Neisseria spp*, *Haemophilus spp*, *Streptococcus pneumoniae*. É composto por uma base nutritiva enriquecida pelos fatores X (hemina) e V (NAD) fornecidos pela hemoglobina e pelo PolyVitex (Mahon e Lehman, 2018).

**Gelose de CNA:** é um meio seletivo para bactérias Gram positivo. A seletividade deste meio baseia-se na presença de CNA, uma mistura de antibióticos (colistina e ácido nalidíxico), a qual inibe o crescimento das bactérias Gram negativo. O crescimento da maioria das bactérias Gram positivo é promovido pelos nutrientes e pelo sangue presente no meio, permitindo este, a visualização de reações hemolíticas (Mahon e Lehman, 2018).

**Gelose de MacConkey:** é um meio diferencial seletivo utilizado para o isolamento e diferenciação de Enterobacteriaceae. Da sua constituição fazem parte peptonas (fornecem nutrientes), cristal violeta e sais biliares que inibem as bactérias Gram positivas, especialmente enterococos e estafilococos. A diferenciação de microrganismos entéricos faz-se através da combinação de lactose e do indicador de pH vermelho neutro (Mahon e Lehman, 2018).

**Gelose Hektoen:** é um meio seletivo para o isolamento e diferenciação de bacilos enteropatogénicos Gram negativos, particularmente *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* A seletividade do meio baseia-se na presença de sais biliares, azul de bromotimol e fucsina ácida (os quais inibem o crescimento das bactérias Gram positivo, *E. coli*, *Proteus* e *Citrobacter*). Os nutrientes das peptonas e dos açúcares permitem um bom crescimento do género *Shigella spp.* Também faz parte da sua constituição tiosulfato de sódio e citrato de ferro o que permite a distinção entre colónias do género *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* através da formação de um centro negro (característico de colónias do género *Salmonella spp.*) (Mahon e Lehman, 2018).

**Gelose ChromID CPS:** meio cromogéneo para a identificação de agentes patogénicos urinários. Permite a identificação direta de *E. coli* e uma identificação presuntiva de algumas bactérias como *Klebsiella spp.*, *Enterococcus spp.* e *Proteus spp.* A sensibilidade de deteção e especificidade de coloração permite uma fácil interpretação do crescimento de colónias neste meio (Chaux et al., 2002).

**Gelose ChromID Candida:** meio cromogéneo para a deteção de infeções fúngicas. Os substratos cromogéneos específicos na gelose são hidrolisados quando entram em contacto com as leveduras, resultando numa coloração específica para uma identificação clara. Permite a identificação direta de *Candida albicans* através da coloração azul, característica desta espécie. Também permite o isolamento de *Candida tropicalis* (Eraso et al., 2006).

**Gelose ChromID Streptococcus grupo B:** meio cromogéneo seletivo para o rastreio de estreptococos do grupo B. Fazem parte da constituição deste meio três substratos cromogéneos que distinguem as colónias de estreptococos do grupo B. A coloração é fácil de visualizar mesmo que haja pouca quantidade de colónias. Este meio tem uma inibição bastante

seletiva da maior parte das bactérias que não pertencem à espécie *Streptococcus agalactiae*, assim como levedura (Biomériux, 2018).

#### 6.4. Produtos Biológicos

No laboratório Fernão Magalhães os produtos biológicos mais frequentes são urina, fezes e exsudados vaginais. Amostras de expetoração são solicitadas com menos frequência e normalmente são solicitadas no âmbito da medicina do trabalho. As hemoculturas são solicitadas aos utentes dos Centros de Diálise que apresenta sintomatologia febril.

Consoante o tipo de produto biológico a pesquisa é orientada para certos organismos (patogénicos habituais) e a flora comensal (Tabela 2).

**Tabela 2- Microrganismos mais comuns na flora comensal e microrganismos potencialmente patogénicos no Homem (Murray e Rosenthal, 2014).**

Zona	Microrganismos comensais	Microrganismos potencialmente patogénicos
<b>Trato respiratório</b>	Nariz e nasofaringe: <i>Streptococcus spp</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Haemophilus parainfluenzae</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> Orofaringe: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenza</i>	Nariz e nasofaringe: <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus spp</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> Orofaringe: Estreptococos do grupo A, <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>Trato gastrointestinal</b>	<i>Clostridium spp</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella spp</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Shigella spp</i> , <i>Clostridium difficile</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>
<b>Trato genito-urinário</b>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Bacteroides spp</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Proteus spp.</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Neisseriae gonorrhoea</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i>
<b>Pele</b>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , Difteroides anaeróbios	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermis</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>Sangue</b>	Produto biológico estéril	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus spp</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterococcus spp</i>

#### 6.4.1. Urina

O produto biológico mais comum para pesquisa de infecção nos laboratórios de ambulatório é a urina.

As infecções urinárias apresentam-se como uma das principais infecções bacterianas que afetam o Ser Humano. Considera-se infecção urinária a presença de bactérias em qualquer parte do sistema urinário (rins, ureteres, bexiga) com exceção da uretra, que poderá ser colonizada com flora normal. As estirpes predominantes neste tipo de infecções são as Enterobactérias, nomeadamente *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (José Barbas Rodrigues e Paula Dias Barroso, 2012).

A urina é colhida para um recipiente estéril e é analisada assim que chega ao laboratório. É semeada em meio apropriado utilizando uma ansa de 10  $\mu$ L, é mergulhada no recipiente onde está a urina não centrifugada. No Laboratório Fernão Magalhães o meio utilizado para a sementeira de urinas é o meio CPS, meio sólido cromogéneo. Após semear a amostra esta é incubada a 37°C durante 18 a 24 horas em atmosfera de aerobiose. Este meio permite fazer uma identificação imediata de colónias de *Escherichia coli* (Figura 5) e uma identificação presuntiva de colónias de *Klebsiella spp*, *Enterococcus spp* e *Proteus spp* (Figura 6). Isto é possível pois o meio CPS contém substratos específicos que são clivados por enzimas produzidas pelas bactérias, como a  $\beta$ -glucuronidase e  $\beta$ -glucosidade. A enzima B-glucuronidase é responsável pela hidrólise dos hidratos de carbono e confere uma cor rosa às colónias típicas de *E. coli*, assim como a enzima B-glucosidade também responsável pela hidrólise dos hidratos de carbono permite obter uma cor azul no caso de colónias de *Enterococcus spp* (Figura 7) e no caso de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Citrobacter* (KESC), embora este último grupo apresente colónias mucosas e maiores, o que permite distinguir de colónias de *Enterococcus spp*. Colónias do género *Proteus spp*, *Providencia spp* e *Morganella spp* apresentam uma tonalidade acastanhada devido à produção de triptofano desaminase responsável pela hidrólise dos hidratos de carbono.



**Figura 6- Observação macroscópica de colónias presuntivas de *Escherichia coli* (Fotografia Laboratório Fernão Magalhães).**



**Figura 5- Observação macroscópica de colónias suspeitas de *Proteus spp* (Fotografia Laboratório Fernão Magalhães).**

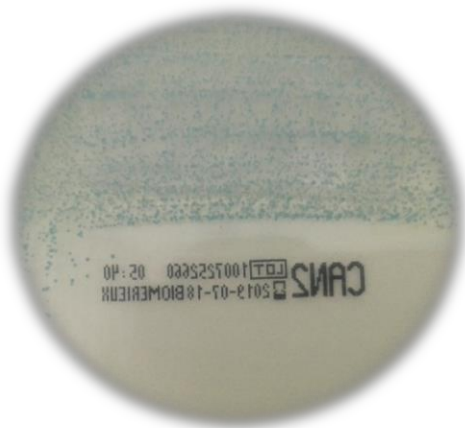


**Figura 7- Observação macroscópica de colónias suspeitas de *Enterococcus spp* (Fotografia Fernão Magalhães).**

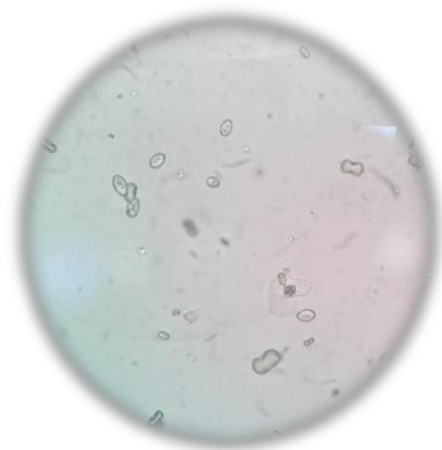
Considera-se uma infeção urinária significativa quando o número de colónias é maior que  $10^5$  UFC/ml, mas tem de se ter em conta o modo como a colheita da amostra foi realizada. Se for uma amostra recolhida por punção supra-púbica da bexiga, qualquer microrganismo presente é relevante, mas se for uma colheita feita através da técnica de jato intermédio já se seguem os critérios acima descritos. O tipo de doente (se é um idoso, uma criança, uma pessoa acamada) e os sintomas descritos pelo mesmo também são importantes para o diagnóstico. Tem de se ter em conta a quantidade de colónias diferentes que aparecem no meio de cultura, pois caso haja crescimento de duas ou mais colónias distintas considera-se que houve uma contaminação da amostra (Scarparo *et al.*, 2002).

No laboratório Fernão Magalhães é sempre feita a análise bioquímica da urina, quer seja pedida ou quer se trate de uma amostra de urina bacteriológica. A análise bioquímica é feita através do aparelho automatizado Aution Max, onde se utiliza tiras reagente mergulhadas na urina e obtém-se os resultados pelo método de leitura por absorvância. Os parâmetros analíticos determinados pelas tiras reagente são: aspeto, densidade, turbidez, leucócitos, eritrócitos, nitritos, glucose, proteínas, bilirrubina, urobilinogénio, corpos cetónicos e pH.

Após a análise bioquímica é realizada a observação do sedimento urinário (Figura 9), de modo a confirmar alguns resultados obtidos pela análise bioquímica (proteínas, leucócitos e eritrócitos) e para avaliar a presença de leveduras, cristais, cilindros e células epiteliais. Quando aparecem leveduras no sedimento urinário, a amostra de urina é semeada no meio de CAN2 (meio cromogéneo para leveduras) para se verificar se ocorre o crescimento destes microrganismos. Se apresentarem uma tonalidade azul são colónias de *Candida albicans* (Figura 8).



**Figura 8- Observação macroscópica de colónias características de *Candida albicans* (Fotografia Laboratório Fernão Magalhães).**



**Figura 9- Observação de células epiteliais de transição e alguns cristais de oxalato de cálcio num sedimento urinário (Fotografia Laboratório Fernão Magalhães).**

#### **6.4.2. Fezes**

As infeções gastrointestinais podem ser infeções virais, bacterianas ou parasitárias e causam gastroenterite, uma inflamação do trato gastrointestinal envolvendo o estômago e intestino delgado. Os sintomas incluem diarreia, vômitos e dor abdominal. A maioria das infeções gastrointestinais são autolimitadas e resolvem-se em poucos dias. O diagnóstico rápido é muito importante no tratamento deste tipo de infeções (Mima *et al.*, 2017) .

No laboratório Fernão Magalhães faz-se essencialmente pesquisa de estruturas parasitárias nas fezes, coproculturas (pesquisa de *Campylobacter spp*, *Salmonella spp* e *Shigella spp*) e pesquisa de sangue oculto.

O exame parasitológico consiste na pesquisa de estruturas parasitárias que possam estar presentes nas fezes, tais como ovos, larvas ou parasitas intestinais. O diagnóstico laboratorial é feito através de dois métodos: exame macroscópico e exame microscópico. O exame macroscópico consiste na análise da amostra fecal quanto à sua consistência e à presença de constituintes anormais tais como sangue, muco ou vermes. No exame

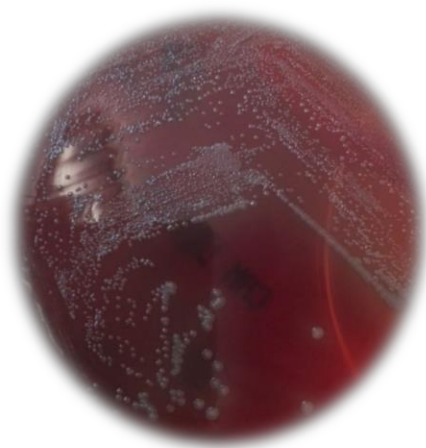
microscópico utilizam-se um *kit* para a preparação de fezes e associa o método de sedimentação e o método de concentração de Ritchie. Esta técnica consiste em dissolver uma quantidade pequena de amostra fecal numa solução de formalina de 10%. Após a dissolução adiciona-se soluto de lugol para ajudar a visualizar melhor as estruturas dos parasitas e posteriormente centrifuga-se a amostra. O sobrenadante é desprezado, visualizando-se o sedimento homogeneizado ao microscópio.

A coprocultura é um exame bacteriológico de fezes. As bactérias mais pesquisadas são *Salmonella spp*, *Shigella spp* e *Campylobacter spp* como foi acima referido.

Para a pesquisa de *Salmonella spp* e *Shigella spp* é necessário em primeiro lugar colocar a amostra num caldo de enriquecimento (no Laboratório Fernão Magalhães utiliza-se GN BBL), uma vez que as fezes são amostras ricas em microrganismos e é necessário proceder ao enriquecimento seletivo dos possíveis agentes patogénicos. A amostra é incubada em aerobiose durante 18 a 24 horas a 37°C, sendo posteriormente semeada em gelose de Hektoen também em condições de aerobiose, durante 18 a 24 horas a 37°C. Colónias típicas de *Salmonella spp* aparecem de cor verde com ou sem centro negro devido à produção de peróxido de hidrogénio. As colónias de *Shigella spp* aparecem incolores. Até agora só é reconhecida uma espécie de salmonela, a *Salmonella enterica* que engloba uma gama diversificada de bactérias que causam um largo espectro de doenças. A *Salmonella enterica* serovar Typhimurium é responsável pela Febre Tifóide, dá origem a quadros febris. A *Salmonella enterica* serovar Paratyphi origina quadros de diarreia infecciosa e é transmitida através de alimentos e águas contaminadas (Crabb *et al.*, 2019). O género *Shigella spp* é responsável por disenteria bacilar. É uma bactéria do trato intestinal e a principal via de contaminação é a via fecal-oral. O género *Shigella* inclui as espécies *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* e *Shigella sonnei*. Todas as espécies são consideradas patogénicas para o Homem apesar de diferirem na severidade da infeção que causam. Estas bactérias invadem a parede intestinal e produzem uma enterotoxina que origina a perda de água e eletrólitos, originando diarreia aquosa com muco e sangue. O quadro clínico é caracterizado por febre, dor abdominal e diarreia (Kang *et al.*, 2019).



Para a pesquisa do género *Campylobacter spp* é necessário semear a amostra no meio *Campylobacter* e inocular a 41,5°C durante 48 horas numa atmosfera microaerofílica. As colónias típicas de *Campylobacter* aparecem de cor cinzento brilhante e de pequenas dimensões (Figura 10). A espécie *Campylobacter jejuni* é a principal espécie dentro do género *Campylobacter* responsável por gastroenterites de origem bacteriana no ser humano. A transmissão da infeção normalmente é feita através de alimentos contaminados, mas também pode ser de pessoa para pessoa. Os sintomas mais comuns são diarreia com fezes sanguinolentas, dores abdominais e febre. Os sintomas duram cerca de uma semana (Levican *et al.*, 2019).



**Figura 10- Observação macroscópica de colónias características de *Campylobacter spp* numa amostra de fezes (Fotografia Laboratório Fernão Magalhães).**

Para a pesquisa de sangue oculto o laboratório utiliza um teste rápido para a deteção qualitativa de hemoglobina humana nas fezes. Este teste baseia-se no método imunocromatográfico no qual é reconhecida hemoglobina humana através de reações de anticorpos específicos. Se a hemoglobina estiver realmente presente na amostra de fezes, reage com o anticorpo monoclonal específico marcado com ouro. Este complexo ouro-anticorpo-hemoglobina migra por ação capilar pela membrana e atinge a região da linha de teste que se encontra pré-revestida com anticorpos anti-hemoglobina. O complexo ouro-anticorpo-hemoglobina é capturado pelos anticorpos imobilizados na membrana, resultando então na formação de linhas vermelhas. Normalmente para esta pesquisa são pedidas amostras de fezes de três dias consecutivos e com alguns cuidados para evitar falsos positivos. É um teste com bastante sensibilidade e alguma especificidade.

### 6.4.3. Expetoração

Para o estudo das infecções do trato respiratório há uma grande variabilidade de amostras tais como: expetorações, aspirados brônquicos, lavado bronco-alveolar, entre outras. A amostra mais frequente é a expetoração, foi a única que segui no meu período de estágio.

Deve-se dar preferência à colheita da primeira amostra da manhã em jejum e alertar para fazer a lavagem da boca antes da colheita apenas com água. Deve-se instruir o doente para colher a amostra de expetoração por uma tosse profunda.

O grande problema no diagnóstico destas infecções é a contaminação das amostras por bactérias da flora comensal da orofaringe durante a colheita. O laboratório só deve processar amostras de boa qualidade. De maneira a observar a qualidade da amostra é realizado um esfregaço através da técnica de estiramento (Figura 11) e corada pela coloração de Gram (Fonseca *et al.*, 2004). A observação ao microscópio é feita através da objetiva de 10x. A qualidade da amostra expetoração é classificada segundo os critérios de Murray e Washington (Tabela 3). Segundo os critérios só as amostras do grupo 4 e 5 é que têm boa qualidade para serem processadas (Murray e Rosenthal, 2014). A expetoração é cultivada em meio PVX, CNA e incubada em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 18 a 24 horas. As amostras também são cultivadas em meio de MacConkey e incubada em aerobiose a 37°C durante 18 a 24 horas.

Muitas vezes também é pedido a pesquisa direta de *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de expetoração. Para isso é necessário realizar um esfregaço da amostra por estiramento e corado através da coloração de Kinyoun uma vez que são bacilos álcool-resistentes

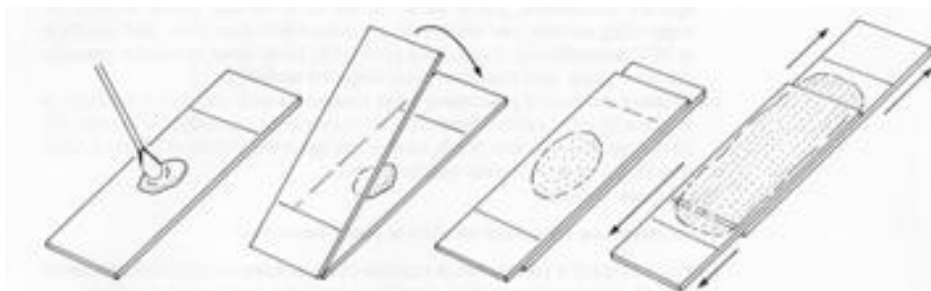


Figura 11 - Preparação de um esfregaço por técnica de estiramento (Fonseca *et al.*, 2004).



Figura 12- Observação macroscópica de colônias típicas de *Haemophilus influenzae* (Fotografia Laboratório Fernão Magalhães).

Tabela 3- Classificação de amostras de expetoração segundo Murray e Washington.

	Células epiteliais (ampliação 10x)	Leucócitos (ampliação 10x)
Grupo 1	>25	10
Grupo 2	>25	10-25
Grupo 3	>25	>25
Grupo 4	10-25	>25
Grupo 5	<10	>25

#### 6.4.4. Exsudado Vaginal ou Uretral

O sistema genital é umas das partes do corpo humano que habitualmente estão colonizadas permanentemente com microrganismos. Da população comensal faz parte uma grande variedade de microrganismos sendo os Bacilos Gram positivo (*Lactobacillus*) os mais numerosos. Algumas infeções do sistema genital feminino são devido a microrganismos endógenos cuja patogenicidade é ativada por fatores do hospedeiro ou desequilíbrio da flora saprófita (Murray e Rosenthal, 2014).

Para a colheita destes exsudados são utilizadas duas zaragatoas. A primeira após a colheita é transportada sem meio característico e a segunda é transportada em meio de carvão.

O processamento destas amostras é constituído por um exame direto e um exame cultural. O exame direto é feito através de observação ao microscópio de uma preparação a fresco entre lâmina e lamela com 0,5% NaCl e de uma coloração de Gram. A preparação a fresco permite-nos avaliar a presença de *Trichomonas vaginalis* uma vez que possibilita visualizar a sua mobilidade, o que é muito característico deste microrganismo. Permite também a observação de elementos leveduriformes. A coloração de Gram permite observar a flora presente na amostra. Deve-se ter em atenção à presença de cocobacilos de gram variável intracelulares (também designados por “clue cells”) pois são indicativos de *Gardnerella vaginalis*.

No exame cultural são utilizados o meio PVX, CNA e CAN2. O meio PVX e CNA são incubados em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> durante 18 a 24 horas a 37°C. O meio de CAN2 é incubado a 37°C durante 72 horas, sendo avaliada a presença de crescimento de 24 em 24 horas. A gelose de PVX pesquisa a presença de *Neisseriae spp* e ocorre o crescimento de bactérias de gram positivo e negativo. Na gelose de CNA ocorre o crescimento bactérias de Gram positivo, patogénicas ou não, e na gelose de CAN2, o crescimento de leveduras.

Em mulheres grávidas, com mais de 30 semanas, é realizada a pesquisa de *Streptococcus* do grupo B (*Streptococcus agalactiae*), no exsudado vaginal e anal. O *S. agalactiae* pode causar meningites no recém-nascido por contaminação na passagem deste pelo canal vaginal na altura do parto. Apesar de não causar infeção na mãe é uma pesquisa indicada para todas as grávidas. Para a pesquisa é utilizada o Caldo de Todd e o meio cromogénio Strepto B. O caldo de Todd é um caldo de enriquecimento específico para o *Streptococcus* do Grupo B. O primeiro passo consiste em colocar a zaragatoa que contém a amostra no caldo de Todd e incubar em aerobiose durante 18 a 24 horas a 37°C. Ao fim de 24 horas inocula-se 10 µL da amostra enriquecida no meio de cultura Strepto B, um meio bastante sensível e específico para baixas taxas de colonização. Incubar em aerobiose durante 18 a 24 horas a 37°C. Ao fim desse tempo se aparecerem colónias com uma tonalidade avermelhada, são sugestivas de *Streptococcus agalactiae*.

#### **6.4.4.1. Pesquisa de *Chlamydia trachomatis***

A espécie *Chlamydia trachomatis* é uma espécie de microrganismos patógenos intracelulares obrigatórios uma vez que não consegue sintetizar ATP. Invade o epitélio do trato genital e replica-se dentro das células. Para conseguir invadir e replicar, a espécie *Chlamydia trachomatis* é capaz de modificar as superfícies epiteliais de maneira a reestruturar o citoesqueleto e as aderências célula-célula, modulando a sinalização celular para atenuar a resposta imunológica (Dolat e Valdivia, 2019). É sexualmente transmissível.

É usado um teste imunocromatográfico para a detecção qualitativa de *Chlamydia trachomatis* em amostras de exsudado cervical feminino e exsudado uretral masculino e urina. Trata-se de um imunoteste de fluxo lateral usado para a detecção do antígeno nas amostras. O anticorpo específico do antígeno de *Chlamydia trachomatis* reveste a região da linha de teste. Durante o teste a solução do antígeno extraído reage com o anticorpo presente na linha de teste.

#### **6.4.5. Sangue**

O sangue é um produto biologicamente estéril, pelo que o aparecimento de um microrganismo numa hemocultura deve ser valorizado pela clínica.

A colheita de sangue para estas amostras deve ter cuidado redobrado para diminuir o risco de contaminação, por isso o local da colheita deve ser bem desinfetado. A colheita é feita por punção venosa e deve ser realizada em três sítios diferentes para que não haja dúvidas se houve contaminação durante a colheita (Murray e Rosenthal, 2014).

É muito importante que se cumpra rigorosamente os volumes recomendados pelo kit usado. O laboratório Fernão Magalhães utiliza o *kit Signal Blood Culture System*. É necessário colher 10 µl de sangue para inocular diretamente nos frascos que contém um caldo de enriquecimento (a sua composição contém maioritariamente Trypticase de Soja). São inoculados em três frascos diferentes pois a colheita é feita em três locais distintos. Quando os frascos são recebidos pelo laboratório, são inoculados durante 1 hora a 37°C antes de se inserir o sistema indicador de crescimento que o *kit* contém. Após 1 hora é colocado o indicador de crescimento em condições de assepsia e durante 7 dias observa-se regularmente as culturas para evidenciar um possível crescimento microbiano. Quando é detetado crescimento a amostra aparece no indicador de crescimento e é essencial isolar no meio de cultura PVX para confirmar o crescimento exibido no kit e também para identificar e testar a sensibilidade aos antimicrobianos. É importante completar a análise com uma coloração de Gram para visualizar as culturas ao microscópio.

#### **6.5. Identificação de microrganismos**

A identificação de microrganismos é realizada quando existe crescimento microbiano, de valorizar, nos meios de cultura. Esta identificação é feita tendo em conta as características fenotípicas, as características de crescimento e as propriedades metabólicas. Uma correta

identificação dos microrganismos tem enorme importância no diagnóstico da infecção e na seleção do tratamento apropriado.

No laboratório Fernão Magalhães é utilizado o Vitek II Compact para o reconhecimento dos microrganismos com crescimento significativo e também para a realização dos respetivos testes de sensibilidade aos antimicrobianos.

A identificação assenta nas características metabólicas e no perfil bioquímico de cada microrganismo. A inoculação, a leitura e a obtenção de resultados são tudo realizados com o auxílio do aparelho Vitek II Compact.

Para cada microrganismo isolado nos meios de cultura é necessário realizar duas suspensões: uma para a identificação bacteriana e outra para a realização do antibiograma. A primeira suspensão é feita colocando o inóculo em 3 ml de solução salina e com uma densidade que tem de estar dentro dos valores 0,55 a 0,65 na escala de McFarland. Quando se trata de bactérias do género *Neisseria spp* ou *Haemophilus spp* o valor da densidade tem de ser de 3 na escala de McFarland. A segunda suspensão é feita a partir de uma diluição em 3 ml de solução salina, da primeira suspensão. No caso de bactérias Gram negativo são usados 145 µl da primeira suspensão, para bactérias Gram positivo são usados 280 µl.

Para a devida identificação e realização do antibiograma são necessárias cartas que são introduzidas dentro do equipamento e no seu interior são transportadas para uma câmara de vácuo que permite a aspiração da suspensão e a inoculação nos poços que as respetivas cartas contêm. Se o microrganismo a isolar for Gram negativo são utilizadas cartas GN, se se tratar de um Gram positivo são utilizadas cartas GP. No caso de *Neisseria spp* e *Haemophilus spp* utiliza-se a carta NH para a respetiva identificação.

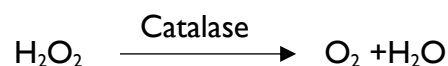
O controlo da solução salina utilizada, para realização das suspensões, é realizado semanalmente e sempre que se muda o lote da solução. Para tal é feita a sementeira em gelose PVX e CAN 2. A ausência de crescimento indica que a solução salina é estéril.

Apesar dos testes de identificação serem automatizados dependem em grande parte de procedimentos manuais que orientam a identificação do microrganismo.

## 6.5.1. Testes Manuais

### 6.5.1.1. Teste da Catalase

Para a deteção desta enzima, coloca-se uma gota de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e com o auxílio de uma ansa adiciona-se uma colónia do microrganismo a testar. Caso o teste seja positivo, a catalase acelera a libertação de  $O_2$  a partir do peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) resultando na libertação de gás. É um teste utilizado principalmente para diferenciar *Staphylococcus spp* de *Streptococcus spp*, uma vez que os *Staphylococcus spp* são catalase positiva e os *Streptococcus spp* são catalase negativa (Murray e Rosenthal, 2014).



### 6.5.1.2. Teste da Coagulase

A coagulase é uma enzima que provoca a formação de coágulos. Especificamente esta enzima pode existir tanto na sua forma livre como ligada à parede da célula bacteriana. A coagulase ligada à parede reage diretamente com o fibrinogénio e converte-o em fibrina. A produção de coagulase livre geralmente ocorre quando o microrganismo é inoculado em meio líquido, atuando sobre a protrombina e formando um complexo que atua sobre o fibrinogénio que é transformado em coágulo de fibrina. A espécie *Staphylococcus aureus* produz coagulase ao contrário da maioria das outras espécies de estafilococos, daí ser um dos testes utilizado para a sua identificação. Existem outros exemplos de espécies de estafilococos que produzem coagulase, mas estas raramente causam infeções no Homem (Murray e Rosenthal, 2014).

A pesquisa da enzima coagulase no laboratório Fernão Magalhães é feita através do kit *Pastorex Staph Plus*. É um teste rápido de aglutinação para a deteção do fator de afinidade com o fibrinogénio (ou designada por coagulase ligada às células) de *Staphylococcus aureus*.

## 6.6. Suscetibilidade Antimicrobiano

A suscetibilidade a antimicrobianos é definida pela capacidade de um agente antimicrobiano inibir o crescimento microbiano. Os resultados desta inibição são importantes para definir o tratamento adequado contra o microrganismo.

No laboratório Fernão Magalhães a avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos é feita no mesmo equipamento onde são realizadas as identificações, o Vitek II Compact. O

equipamento mede a atividade antimicrobiana por métodos quantitativos (CMI, Concentração Mínima Inibitória) e qualitativos (se é resistente, intermédio ou sensível). Utilizam-se cartas de sensibilidade que contêm poços com antimicrobianos em concentrações conhecidas e direcionadas para um grupo específico de microrganismos. A inibição do crescimento é avaliada pela ausência de turvação no meio. O *software* do Vitek faz uma comparação dos resultados obtidos com uma base de dados. A escolha das cartas para avaliar a suscetibilidade dos antimicrobianos é feita de acordo como o tipo de microrganismo em questão.

**Tabela 4- Cartas utilizadas para avaliar a suscetibilidade dos antimicrobianos.**

<b>AST- 354</b>	Carta utilizada para Enterobactérias e outras bactérias Gram negativo
<b>AST-359</b>	Carta utilizada para <i>Pseudomonas spp</i>
<b>AST-586</b>	Carta utilizada para <i>Streptococcus spp</i>
<b>AST- 648</b>	Carta utilizada para <i>Staphylococcus spp</i>

## **6.7. Serologia Infeciosa**

### **6.7.1. Venereal Disease Research Laboratory (VDRL)**

A sífilis é uma infecção sexualmente transmissível causada por uma bactéria intracelular obrigatória designada por *Treponema pallidum*. A infecção pode dividir-se em 3 fases distintas: primária, secundária e terciária. Após a inoculação do microrganismo existe um período latente que dura cerca de 3 semanas. Depois deste período começam a aparecer úlceras em várias partes do corpo (Streight, Paranal e Musher, 2019).

O diagnóstico desta doença é feito normalmente através de um exame serológico não treponémico do tipo VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) como primeiro teste diagnóstico. É um ensaio de aglutinação não treponémica, onde se utiliza uma solução de cardioplipina com partículas de carvão.

A VDRL normalmente é reativa 4 a 6 semanas após a infecção ou 1 a 3 semanas após o aparecimento da lesão primária. Se a VDRL for reativa, a prova deverá ser quantificada, através da titulação de reaginas e confirmada por uma prova serológica treponémica (Saúde e Divisão de Saúde Materna, 2000).



## **6.8. Diagnóstico Viral**

O diagnóstico viral realizado no Laboratório Fernão Magalhães é feito através da detecção de anticorpos no soro com o auxílio de métodos automatizados através dos equipamentos Centaur e Cobas. Os anticorpos pesquisados com mais frequência são anti-Hepatite A, anti-Hepatite B, anti-Hepatite C, anti-Hepatite E, anti-Citomegalovírus, anti-vírus da Rubéola, anti – HIV, anti-vírus Epstein Bairr.

## **7. Hematologia**

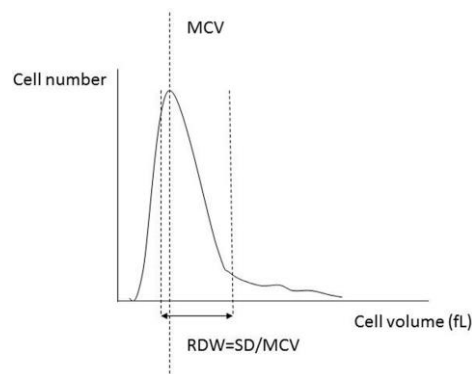
A Hematologia é a área do laboratório onde se avalia a atividade funcional dos elementos figurados do sangue periférico, dos seus percursores e o processo de hemostase. Faz-se a análise quantitativa e qualitativa das células sanguíneas e dos índices eritrócitários como Volume Globular Médio (VCM), Hemoglobina Globular Média (HCM), Concentração Hemoglobina Globular Média (CHCM) e a informação sobre a distribuição do tamanho dos glóbulos vermelhos, do inglês “*Red Cell Distribution Width*” (RDW).

No Laboratório Fernão Magalhães na área de Hematologia os equipamentos automatizados utilizados são: ABX PentraML, Sysmex Ca-200 e Ves-Matic 30.

O ABX PentraML é utilizado para a contagem de células sanguíneas, com diferencial leucocitário e contagem de reticulócitos. Tudo isto é realizado pelo método de impedância. Este método baseia-se na determinação de mudanças de condutividade durante a passagem das células sanguíneas por uma pequena abertura entre dois eletrodos. Esta pequena abertura por onde as células passam possui um diâmetro e um comprimento pré-definidos de acordo com o tipo de célula que se quer contar. Mudanças na impedância são proporcionais aos volumes das células sanguíneas, assim permite contá-las e separá-las por tamanho. Com base na amplitude do impulso elétrico que é gerado é determinado o histograma (Figura 13) (Hoffbrand e Moss, 2013). A técnica de citometria de fluxo é utilizada para a realização da fórmula leucocitária.

O Ves-Matic 30 é utilizado para determinar a velocidade de sedimentação através de um método automatizado equivalente ao método de Westergren.

O Sysmex CA-620 é utilizado para os testes de hemostase, mais concretamente para avaliação do tempo de tromboplastina parcial ativado (aPTT) e o tempo de protrombina (PT). Calcula também o valor da razão internacional normalizada (INR, do inglês “*international normalized ratio*”).



**Figura 13- Histograma normal da contagem de eritrócitos (Athnasiou et al., 2018).**

### 7.1. Hematopoiese

A hematopoiese compreende no processo de divisão, diferenciação e maturação celular a partir de uma célula estaminal (célula mais primitiva) até aos diferentes tipos de células sanguíneas (Antoniani, Romano e Miccio, 2017). Nos primeiros dias de gestação a hematopoiese decorre no saco vitelino. Das seis semanas até ao nascimento ocorre no fígado e no baço, posteriormente, e durante toda a vida adulta, ocorre na medula óssea (Turgeon e Turgeon, 1999).

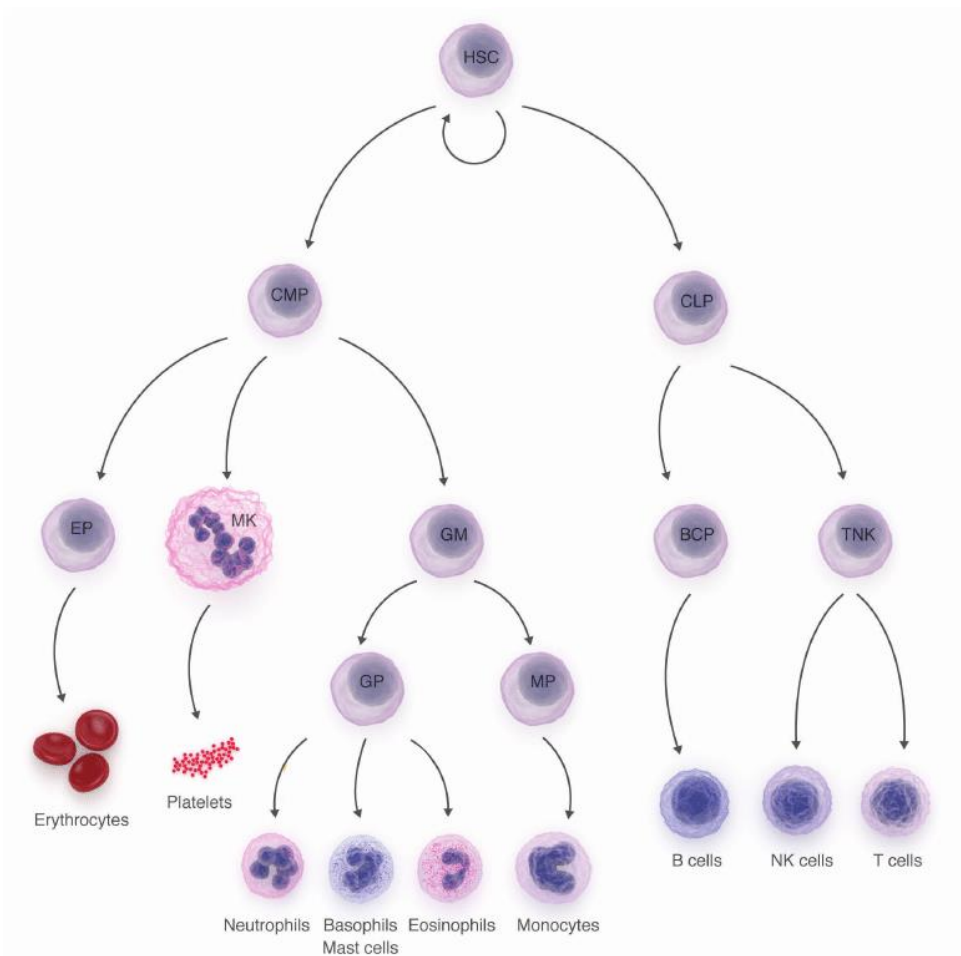
A hematopoiese inicia-se com uma célula primordial que tanto pode autorrenovar-se como também dar origem às diferentes linhagens celulares. Este processo começa com mitoses da célula primordial e em cada divisão uma célula filha substitui a célula primordial, ficando a célula inicial sujeita à diferenciação. A seleção da linhagem de diferenciação pode variar por alocação aleatória como por sinais externos recebidos pela célula primordial (Hoffbrand e Moss, 2013).

As células do sangue têm um tempo de vida limitado e necessitam de se renovar de forma continuada e constante. Em algumas situações fisiológicas ocorre o aumento da produção de células sanguíneas, como por exemplo, quando existe perdas de sangue ou no caso de uma infeção (Springuel, Renauld e Knoops, 2015).

A hematopoiese é um processo controlado por diversos fatores para que não ocorra possibilidade de se desenvolver uma patologia. Os fatores que a controlam são glicoproteínas que existem no organismo e controlam a produção das células sanguíneas. Cada fator de crescimento é codificado por um gene diferente. Um desses fatores é a eritropoietina, uma

hormona produzida pelo rim e que controla a produção dos glóbulos vermelhos (eritropoiese). Fator de crescimento dos granulócitos é produzido por algumas células envolvidas na defesa contra infecções e regula a produção de glóbulos brancos. A trombopoietina também faz parte dos fatores que regulam a hematopoiese, é uma glicoproteína produzida pelo fígado e pelo rim e estimula a produção de plaquetas.

Todos estes fatores são produzidos conforme as necessidades do organismo. Podem causar não só a proliferação celular, mas também podem estimular a diferenciação, a maturação, prevenir a apoptose e afetar as funções das células maduras (Hoffbrand *et al.*, 2019).



**Figura 14- Hematopoiese. A hematopoiese inicia-se com a célula hematopoiética (HSC). A célula hematopoiética pode dar origem a novas células ou autorrenovar-se. CMP (célula progenitora mieloide); CLP (célula progenitora linfóide); EP (precursor dos eritrócitos); MK (megacariócito); GM (precursor dos macrófagos granulócitos); BCP (célula precursora das células B) TNK (célula precursora das células NK e T); GP (precursor dos granulócitos) e MP (precursor dos macrófagos) (Springuel, Renaud e Knoops, 2015).**

## **7.2. Hemograma**

O hemograma é um conjunto de avaliações das células do sangue, que reunido aos dados clínicos, permite tirar conclusões diagnósticas e prognósticas de um grande número de patologias. É um dos exames laboratoriais mais solicitados pelos médicos.

Esta análise laboratorial é composta por três determinações onde se inclui a avaliação da série vermelha (eritrócitos), da série branca (leucócitos) e das plaquetas.

Da análise da série vermelha fazem parte as seguintes determinações: contagem de eritrócitos (RBC), dosagem da hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM). Também se consegue obter as informações sobre o RDW.

Na análise da série branca é feita a contagem total de glóbulos brancos, assim como a contagem diferencial: número de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e monócitos.

As plaquetas são analisadas quantitativamente e também é possível obter o resultado da amplitude da superfície das plaquetas quantificadas (PDW), assim como o volume médio plaquetário (MPV).

No Laboratório Fernão Magalhães todos os parâmetros do hemograma são analisados, como já referido anteriormente, através do ABX PentraML. Para garantir resultados de confiança é necessário fazer diariamente o controlo do aparelho. Para isso, são necessários três níveis de controlo diferentes (normal, alto e baixo) onde se utilizam apenas dois cada dia intercalando entre os níveis alto e baixo.

### **7.2.1. Eritrócitos**

Os eritrócitos são células em forma de disco bicôncavo flexível com cerca de 8  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Deve ser capaz de passar repetidamente através da microcirculação cujo diâmetro mínimo é de 3,5  $\mu\text{m}$ . O seu tempo de meia vida é de cerca 120 dias (Hoffbrand e Moss, 2013).

A principal função dos eritrócitos é o transporte de oxigénio até aos tecidos e o retorno de dióxido de carbono dos tecidos até aos pulmões. Para que esta troca gasosa ocorra, os eritrócitos contêm uma proteína especializada, a hemoglobina (González-Alonso *et al.*, 2006).

### 7.2.2. Hemoglobina

A hemoglobina é uma proteína especializada, existente nos eritrócitos e permite realizar as trocas gasosas entre os tecidos e os pulmões. Cada molécula de hemoglobina consiste em quatro cadeias polipeptídicas, cada uma com o seu próprio heme. O grupo heme forma-se através da combinação da protoporfirina com o ferro no seu estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Cada molécula de heme combina-se com uma cadeia de globina. Assim forma-se um tetrâmero de cadeia de globina (Pairet e Jaenicke, 2010).

As principais hemoglobinas no adulto são Hb A ( $\alpha_2\beta_2$ ) 96% a 98%, Hb A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) 1,5% a 2,3% e Hb F ( $\alpha_2\gamma_2$ ) 0,5% a 0,8% (Ma *et al.*, 2019).

Se os valores de hemoglobina estiverem abaixo dos valores de referência para a idade e sexo, é um indicador de anemia.

### 7.2.3. Hematócrito

O hematócrito é a percentagem de eritrócitos, na massa de sangue, após centrifugação. No autoanalisador, é determinado o volume corpuscular médio (VCM) que juntamente com o número de glóbulos vermelhos, permite fazer o cálculo do valor do hematócrito, através da fórmula:

$$\text{Ht (L/L)} = \frac{\text{VCM (fL)} \times \text{RBC (10}^{12}/\text{L)}}{10^3}$$

O resultado pode ser apresentado em percentagem ou litro/litro. Um valor de hematócrito baixo está associado a uma diminuição do número de eritrócitos devido a hemólise, hemorragia ou devido a uma eritropoiese ineficaz (responsável pela produção de eritrócitos e do seu volume celular). Quanto a um valor de hematócrito alto pode ser devido à presença de um elevado número de eritrócitos ou a uma diminuição do volume de plasma (Hoffbrand e Moss, 2013).

#### **7.2.4. Volume Corpuscular Médio**

O volume corpuscular médio (VCM) determina o tamanho médio de um glóbulo vermelho. Ao dividir o volume ocupado pelos glóbulos vermelhos pelo número total destes, obtemos o volume globular médio. O resultado é expresso em fentolitros (fL)(GREEN, 1950).

Um VCM elevado indica eritrócitos grandes e um VCM diminuído indica tamanhos diminuídos. Este parâmetro ajuda a diferenciar os vários tipos de anemia existentes. Se o valor VCM estiver diminuído classifica-se a anemia como microcítica. Em casos em que os valores estejam aumentados designa-se por anemia macrocítica. Valores dentro dos limites dos valores de referência indicam uma anemia normocítica (GREEN, 1950).

#### **7.2.5. Hemoglobina Corpuscular Média**

A hemoglobina corpuscular média (HCM) indica a hemoglobina que existe dentro de cada eritrócito. Se se dividir a quantidade de hemoglobina pelo número de eritrócitos, obtemos o valor de HGM. O resultado é dado em picogramas (pg).

Este parâmetro permite caraterizar os eritrócitos quanto à sua coloração. Quando existe pouca quantidade hemoglobina no eritrócito são designados por hipocrómicos. Nas anemias microcíticas podemos encontrar este valor diminuído e nas anemias macrocíticas aumentado (GREEN, 1950).

#### **7.2.6. Concentração Hemoglobina Globular Média**

A concentração de hemoglobina globular média corresponde à proporção média de hemoglobina dentro de cada eritrócito. Ao concentrar em cada eritrócito a hemoglobina nele contida obtém-se a (CMHG). O resultado é expresso em g/dL.

Este parâmetro, tal como o anterior, também permite classificar os eritrócitos em hipocrómicos, caso o valor esteja diminuído. Em situações de anemia macrocítica o valor da CMHG encontra-se normal uma vez que o VCM e o HCM encontram-se ambos elevados. Em situações de anemia falciforme ou esferocitose hereditária o valor está aumentado (GREEN, 1950).

### **7.2.7. Distribuição do Diâmetro dos Eritrócitos (RDW)**

O RDW é o índice que avalia o tamanho dos eritrócitos. Representa a percentagem de variação dos volumes obtidos. Também é designado por índice de anisocitose eritrocitária. É muito comum o RDW estar elevado em situações de carência de ferro, pois como existe falta deste elemento há impedimento da formação de hemoglobina normal, o que leva à formação de eritrócitos de tamanho mais reduzido (GREEN, 1950).

### **7.2.8. Contagem Diferencial de Leucócitos**

A contagem diferencial leucocitária é uma parte fundamental da hematologia, devido às suas principais implicações para o diagnóstico e acompanhamento de doenças hematológicas, como leucemias agudas e crônicas, distúrbios mieloproliferativos e linfoproliferativos e síndromes mielodisplásicas. A adequada identificação e enumeração dos diferentes subgrupos de leucócitos é também uma ajuda para o diagnóstico de inflamação ou infecção (Kottke-Marchant e Davis, 2012). O equipamento utilizado para a contagem diferencial de leucócitos baseia-se em dois princípios essenciais: a mediação de volume e complexidade celular. O volume celular é obtido através da medição celular. A complexidade celular é determinada utilizando um reagente específico. Este reagente promove a lise dos eritrócitos, estabiliza os leucócitos nas suas formas nativas e faz a contagem diferencial dos leucócitos (Zheng e Tan, 2019).

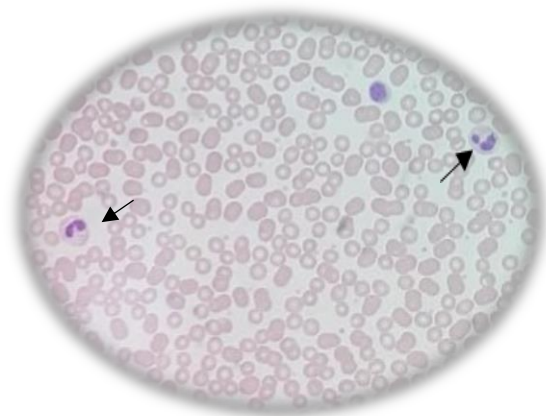
### **Neutrófilos**

Os neutrófilos são leucócitos que em conjunto com os eosinófilos e os basófilos constituem o grupo dos granulócitos polimorfonucleares. São células que possuem um núcleo denso (muito característico) com dois a cinco lóbulos e citoplasma claro com contorno irregular. Contém muitos grânulos finos rosa-azulados (Figura 15). Os grânulos são divididos em primários (aparecem no estágio de promielócito) e secundários (específicos), surgem no estágio de mielócito e predominam no neutrófilo maduro. A vida dos neutrófilos no sangue é de apenas 6 a 10 horas (Hoffbrand e Moss, 2013).

Embora conhecidas como células imunes inatas especializadas na eliminação de microrganismos patogênicos invasores, o papel mais complexo dos neutrófilos é na modulação das respostas inflamatórias locais. Os neutrófilos ativados moldam as respostas inatas e adaptativas, produzindo uma variedade de mediadores biológicos. Libertam substâncias

citotóxicas e apresentam granações citoplasmáticas grosseiras, no caso de infecção ou inflamação (Wang, Pan e Liu, 2019).

Quando existe um elevado número de neutrófilos na contagem diferencial de leucócitos designa-se por neutrofilia. Ao contrário, se a contagem tiver um número baixo está presente uma neutropenia.



**Figura 15- Observação microscópica de neutrófilos num esfregaço de sangue periférico após coloração de May Grunwald Giemsa (objetiva 100x) (Fotografia Laboratório Fernão Magalhães).**

## **Eosinófilos**

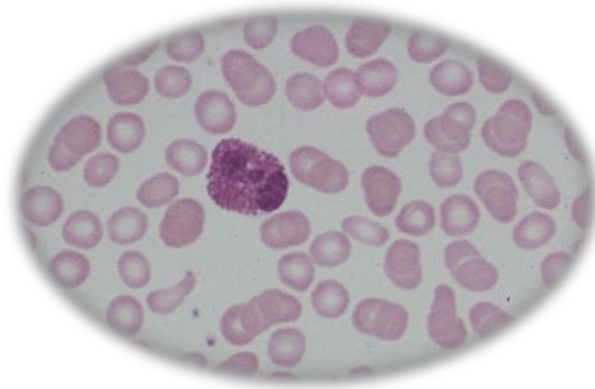
Os eosinófilos são semelhantes aos neutrófilos menos em relação aos grânulos citoplasmáticos pois são muito maiores, coram de vermelho alaranjado (devido à afinidade com corantes ácidos, por exemplo eosina) e raramente têm mais do que três lóbulos nucleares (Figura 16).

São bem conhecidos devido ao seu papel na defesa do hospedeiro contra parasitas e nas doenças alérgicas. A lista de doenças humanas nas quais os eosinófilos podem desempenhar um papel patológico é vasta (Vanharen e Girard, 2019).

São considerados células móveis versáteis que controlam e regulam as múltiplas vias biológicas. Estas células armazenam os inúmeros grânulos específicos, que estão biologicamente ativos, para uma rápida libertação de mediadores químicos (histamina e proteínas). São produzidos e maturados na medula óssea e, em seguida, transferidos para os tecidos-alvo através da circulação (Loktionov, 2019).

O tempo de vida dos eosinófilos no sangue é maior do que o dos neutrófilos (Hoffbrand e Moss, 2013).

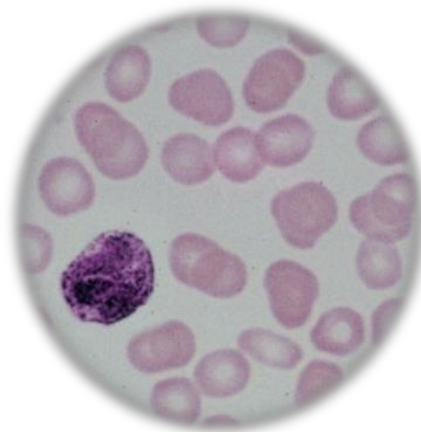




**Figura 16- Observação microscópica de eosinófilos num esfregaço de sangue periférico após coloração de May Grunwald Giemsa (objetiva 100x) (Woodcock, 1990).**

### **Basófilos**

Os basófilos são leucócitos polinucleados (Figura 17) considerados, com os eosinófilos, a principal população de granulócitos ativos nas reações alérgicas. Estão envolvidos na imunidade inata, libertando histamina, prostaglandinas e citocinas (IL4 e IL13). Estes mediadores imunológicos desempenham um papel importante nas reações alérgicas. São células com numerosos grânulos citoplasmáticos escuros que não permitem visualizar o núcleo. Nas reações alérgicas os basófilos e os mastócitos têm funções semelhantes, revelando ambos uma alta afinidade para a ligação da imunoglobulina E (Chirumbolo *et al.*, 2018).



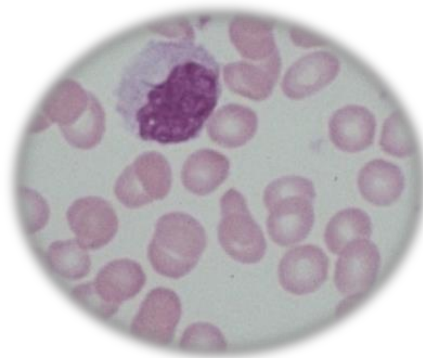
**Figura 17- Observação microscópica de basófilos num esfregaço de sangue periférico após coloração de May Grunwald Giemsa (objetiva 100x) (Woodcock, 1990).**

## **Monócitos**

Os monócitos são células com núcleo grande, central, oval com cromatina aglomerada. O citoplasma cora-se de azul e contém vacúolos finos. São maiores que os restantes leucócitos (Figura 18).

Permanecem pouco tempo na medula óssea, no sangue permanecem cerca de 20 a 40 horas até entrarem nos tecidos, onde amadurecem e desempenham as suas funções. Depois de ocorrer a transformação em macrófagos, o tempo de vida pode prolongar-se durante vários meses ou anos. A principal função dos monócitos é a defesa contra microrganismos através do mecanismo de fagocitose (Park *et al.*, 2019).

O aumento do número de monócitos (monocitose) pode estar associado a infeções bacterianas crónicas tais como tuberculose, febre tifoide, brucelose. Infeções por protozoários, neutropenia crónica e leucemia mieloide aguda também estão dentro das causas de uma monocitose (Bunney, P. E., Zink, A. N., Holm, A. A., Billington, C. J., & Kotz, 2017).



**Figura 18- Observação microscópica de monócitos num esfregaço de sangue periférico após coloração de May Grunwald Giemsa (objetiva 100x) (Woodcock, 1990).**

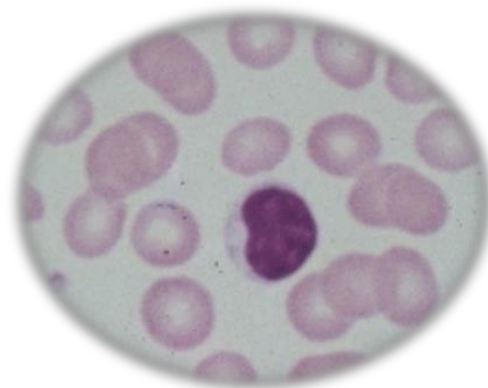
## **Linfócitos**

Os linfócitos são células imunologicamente competentes. A resposta imunológica depende de três tipos de linfócitos: células B (imunidade humoral), T (imunidade celular) e células “*natural killer*” (células NK). Os linfócitos B sofrem maturação na medula óssea e circulam no sangue periférico até adquirirem reconhecimento de um antígeno. Após existir o reconhecimento de um antígeno, estes linfócitos maturam para células B de memória e plasmócitos. Estes últimos regressam à medula óssea. O recetor dos linfócitos B é uma imunoglobulina ligada à membrana. O linfócito depois de ser ativado passar a sintetizar e secretar imunoglobulinas (Boothby, Hodges e Thomas, 2019).

Os linfócitos T sofrem a sua maturação no timo, onde se diferenciam em linfócitos T maduros. Os linfócitos T maduros classificam-se em linfócitos T auxiliares (são células maduras que expressam CD4) e em linfócitos T citotóxicos (são células maduras que expressam CD8) (Moro-García *et al.*, 2018).

As células NK são células naturalmente citotóxicas, mas não têm recetor de células T. São grandes com grânulos no citoplasma que contém granzimas. Estas células são orientadas para destruir as células-alvo durante uma infeção (Abel *et al.*, 2018). Os linfócitos não se distinguem entre si pela morfologia (Figura 19), apenas pela presença na membrana celular, de glicoproteínas ou marcadores fenotípicos e podem ser determinados por técnicas imunológicas como imunofluorescência ou citometria de fluxo (Silva *et al.*, 2016).

Um alto número na contagem de linfócitos (linfocitose) é comum em lactentes e em crianças para dar resposta às infeções causadas principalmente por vírus Epstein-Barr (EBV) e Citomegalovírus (CMV). Uma linfopenia (baixo número de linfócitos) pode ocorrer devido a insuficiência da medula óssea, em tratamentos onde são utilizados corticosteroides, no caso de Linfoma de Hodgkin e HIV (Hoffbrand e Moss, 2013).



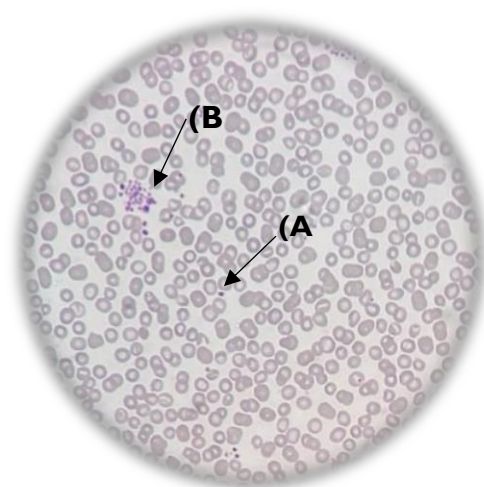
**Figura 19- Observação microscópica de linfócitos num esfregaço de sangue periférico após coloração de May Grunwald Giemsa (objetiva 100x) (Woodcock, 1990).**

### 7.2.9. Plaquetas

As plaquetas são produzidas na medula óssea por fragmentação do citoplasma dos megacariócitos. Os megacariócitos maduros são células grandes, com um núcleo lobulado. As plaquetas formam-se pela fragmentação das extremidades das extensões do citoplasma do megacariócito, podendo cada um dar origem entre 1000 a 5000 plaquetas (Trotta *et al.*, 2018).

As plaquetas são células muito pequenas e discoides. As glicoproteínas que estão a revestir a superfície destas células são importantes nas reações de adesão e agregação para formar um tampão plaquetário durante a hemostase. Esta é a principal função das plaquetas, a formação de um tampão durante a resposta hemostática normal à lesão vascular (Kottke-Marchant e Davis, 2012).

A contagem de plaquetas é obtida através do princípio de impedância. Quando os valores estão abaixo dos valores de referência (trombocitopenia) é necessário confirmar os valores obtidos através da visualização ao microscópio do esfregaço sanguíneo (Figura 20). Este procedimento é feito pelo facto de poderem estar presentes agregados plaquetários e se isto acontece o aparelho conta cada agregado de plaquetas como apenas uma célula e assim obtém-se uma falsa trombocitopenia. Uma verdadeira trombocitopenia pode derivar de uma insuficiência da medula óssea ou devido ao aumento do consumo de plaquetas (em casos de infeção, por exemplo). Trombocitose acontece quando o número de plaquetas está elevado em relação aos valores de referência. Esta situação resulta do aumento da produção de plaquetas pela medula óssea e está ligada ao aumento do risco de formação de trombos no interior dos vasos sanguíneos. A trombocitose pode estar associada a hemorragia, infeção, inflamação, cirurgia, diminuição da função do baço, entre outras (Nguyen *et al.*, 2016).



**Figura 20- Observação microscópica de plaquetas (A) e agregados plaquetários (B) num esfregaço de sangue periférico após coloração de May Grunwald Giemsa (objetiva 40x). (Fotografia Laboratório Fernão Magalhães).**

### **7.3. Contagem de Reticulócitos**

A contagem de reticulócitos é um indicador indireto da atividade da eritropoietina na medula óssea. Permite-nos avaliar a capacidade da medula em produzir eritrócitos (Hoffbrand e Moss, 2013).

Os reticulócitos são células provenientes do processo de maturação do eritroblasto. Após a perda do núcleo dos eritroblastos, ficam apenas alguns componentes na célula nomeadamente ribossomas, RNA mensageiro e mitocôndrias. A designação de reticulócitos deve-se aos precipitados de cor azul que as células apresentam devido à existência de resíduos de material nuclear (Turgeon e Turgeon, 1999).

A contagem de reticulócitos no Laboratório Fernão Magalhães é feita através de um método automatizado utilizando a Pentra PML, o mesmo onde são realizados os hemogramas.

Esta contagem é importante uma vez que pode dar informações importantes sobre perdas de sangue ou de uma possível anemia. Em situações de anemia os valores podem aumentar, uma vez que pode haver estímulo da medula óssea ou pode haver uma diminuição dos valores, caso haja um defeito na produção de eritrócitos (Bridges e Pearson, 1986).

A percentagem normal de reticulócitos num adulto é entre 0,5% a 2,5% e a contagem absoluta é de 25 a  $125 \times 10^9/L$  (Hoffbrand e Moss, 2013).

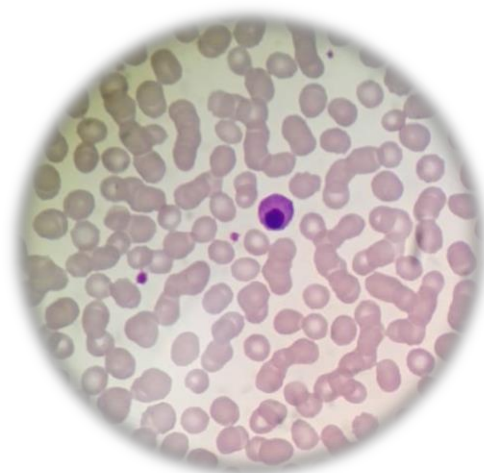
### **7.4. Esfregaço de Sangue Periférico**

Os dados do hemograma e a observação morfológica do sangue periférico têm um papel fundamental no diagnóstico de muitas doenças hematológicas. Apesar dos esfregaços sanguíneos serem realizados em menor número, devido ao desenvolvimento dos instrumentos automatizados, estes continuam a ser importantes para ajudar na interpretação dos resultados obtidos do hemograma. Segundo a Direção Geral de Saúde é recomendado realizar um esfregaço sanguíneo no caso da diminuição da concentração de hemoglobina (anemia), se houver alterações no volume globular médio (aumento ou diminuição), alterações na forma leucocitária e alterações na contagem de plaquetas (trombocitopenia ou trombocitose) (George, 2012).

No laboratório Fernão Magalhães os esfregaços sanguíneos são feitos manualmente e corados por May-Grünwald-Giemsa. Após a secagem do esfregaço este é fixado com metanol. Após a fixação o esfregaço é corando com azul de metileno, um corante básico, cora apenas

estruturas basófilas (ácidos nucleicos, basófilos, neutrófilos). Posteriormente é corado com eosina, um corante ácido, cora estruturas acidófilas (hemoglobina e as granulações dos eosinófilos) (Silva *et al.*, 2016).

No esfregaço sanguíneo (Figura 21) é possível visualizar as diferentes morfologias que os glóbulos vermelhos podem adotar, consoante a patologia responsável, glóbulos brancos e plaquetas.



**Figura 21- Observação microscópica de um esfregaço de sangue periférico que contém um eritroblasto, após coloração de May Grunwald Giemsa (objetiva 100x) (Fotografia Laboratório Fernão Magalhães).**

## **7.5. Anemias**

Uma anemia é definida como diminuição da concentração de hemoglobina no sangue, tendo em conta a idade e o sexo. A diminuição da hemoglobina normalmente é acompanhada por um baixo número de glóbulos vermelhos e do hematócrito. A principal função desta proteína é a oxigenação dos tecidos, pelo que a sua diminuição vai causar efeitos prejudiciais no organismo.

A classificação das anemias é feita com base na origem e no mecanismo fisiopatológico da anemia e também a partir do tamanho e quantidade de hemoglobina presente nos eritrócitos. Em termos fisiopatológicos a anemia pode ser devido a alteração da produção, destruição aumentada ou aumento da perda de eritrócitos. Segundo as constantes eritrócitárias VCM e HCM, a anemia pode classificar-se em microcítica, normocítica ou macrocítica segundo o valor de VCM. A partir do valor de HCM pode classificar-se em hipocrómica ou normocrómica (Tabela 5) (Chulilla, Colás e Martín, 2009).

**Tabela 5- Classificação da anemia.**

<b>Anemia</b>	<b>Índices eritrocitários</b>	<b>Causas</b>
<b>Microcítica, hipocrômica</b>	VCM < 80 fL HCM < 27 pg	Deficiência de ferro Talassemias Anemia sideroblástica
<b>Normocítica, normocrômica</b>	VCM = 80-95 fL HCM ≥ 27pg	Anemia de doenças crônicas Muitas anemias hemolíticas Insuficiência da medula óssea
<b>Macrocítica</b>	VCM > 95 fL	Megaloblástica: deficiência de vitamina B <sub>12</sub> e ácido fólico Não megaloblástica: abuso de álcool, hepatopatia

### **7.5.1. Anemia microcítica e hipocrômica**

A hemoglobina é uma proteína formada por dois pares de cadeias globínicas e um grupo heme composto por íão de ferro no estado ferroso num anel de protoporfirina. Se existir falta de ferro para a formação do grupo heme ou alguma alteração na estrutura das cadeias de globina, a síntese de hemoglobina fica comprometida, o que vai originar eritrócitos mais pequenos (microcitose) e pálidos (hipocromia). A falta de ferro, talassemias e as alterações do metabolismo do grupo heme estão entre as causas destas anemias (Chulilla, Colás e Martín, 2009).

#### **Anemia por deficiência de ferro**

A deficiência de ferro é a causa mais comum de anemia microcítica e hipocrômica. As duas constantes eritrócitárias (o VCM e a HCM) estão diminuídas e no esfregaço de sangue periférico consegue-se observar eritrócitos pequenos (microcitos) e pálidos (hipocrômicos). Estes aspetos são devido aos defeitos na síntese de hemoglobina por falta de ferro. Nestes casos, é iniciado tratamento com ferro oral, caso o problema não seja má absorção ou perdas constantes de ferro (Jimenez, Kulnigg-Dabsch e Gasche, 2015).

#### **Talassemias**

As talassemias são um grupo heterogêneo de distúrbios genéticos que resultam numa síntese diminuída das cadeias  $\alpha$  ou  $\beta$  da hemoglobina.

A hemoglobina A (HbA) é constituída por duas cadeias globínicas  $\alpha$  e duas cadeias globínicas  $\beta$ . Se ocorrer a deficiência na síntese de uma destas cadeias, a hemoglobina não se

forma corretamente e não pode transportar oxigênio suficiente, provocando assim anemia (Maskoen *et al.*, 2019).

A talassémia é uma doença hereditária causada por uma mutação genética ou uma deleção de certos fragmentos de genes. A  $\alpha$ -talassémia é causada pela deleção do gene da  $\alpha$ -globina no cromossoma 16 que resulta na produção reduzida ou ausente de cadeias de  $\alpha$ -globina. O gene da  $\alpha$ -globina tem 4 alelos e a gravidade da doença varia dependendo do número de deleções dos alelos. A deleção de quatro alelos é a forma mais grave em que nenhuma  $\alpha$ -globina é produzida e o excesso de cadeias  $\gamma$  (presentes durante o período fetal) formam o tetrâmero de Hb. Esta deleção é incompatível com a vida. Uma deleção do alelo é a forma mais leve e é clinicamente silenciosa (Origa e Moi, 2019).

A  $\beta$ -talassémia resulta de mutações pontuais no gene da  $\beta$ -globina localizado no cromossoma 11. Uma mutação heterozigótica resulta numa  $\beta$ -talassemia menor, na qual as cadeias  $\beta$  são subproduzidas. Estes casos são geralmente assintomáticos. A  $\beta$ -talassemia major é causada por uma mutação homozigótica do gene da  $\beta$ -globina, resultando na ausência total de cadeias  $\beta$ . O excesso de cadeias  $\alpha$ -globina na  $\beta$ -talassemia agregam e formam precipitados que danificam as membranas dos glóbulos vermelhos, resultando numa hemólise intravascular. Isto leva a uma eritropoese ineficaz (Yilmaz, 2019).

### **7.5.2. Anemia Macrofítica**

As anemias macrofíticas caracterizam-se por aparecerem eritrócitos com um tamanho grande. Podem ser divididas em anemias megaloblásticas e não megaloblásticas.

#### **Anemia megaloblástica**

Nas anemias megaloblásticas os eritroblastos apresentam um atraso da maturação do núcleo em relação à do citoplasma. Este atraso deve-se a um defeito na síntese de DNA, causado em geral por deficiência de vitamina B<sub>12</sub> ou de folato. As causas mais frequentes são a deficiência nutricional de folato e déficit de fator intrínseco o que não permite a absorção de vitamina B<sub>12</sub> (Bridges e Pearson).

Os dados laboratoriais apresentam uma contagem de reticulócitos baixa e a contagem de leucócitos e de plaquetas também pode estar diminuída (Bachmeyer *et al.*, 2019).

No sangue periférico é possível visualizar macrócitos ovais, os neutrófilos apresentam núcleo hipersegmentado (seis ou mais lóbulos). Na medula óssea os eritroblastos são grandes e consegue-se visualizar a falta de maturação.



## **Anemia não megaloblástica**

O mecanismo de formação dos glóbulos vermelhos numa anemia não megaloblástica ainda não está bem definido. No entanto, existem muitas causas de anemia não megaloblástica tais como: hepatopatia, abuso de álcool, tabagismo, hipotireoidismo, entre outras (Hoffbrand e Moss, 2013).

### **7.5.3. Anemia Hemolítica**

A destruição normal dos eritrócitos ocorre geralmente ao fim de 120 dias, pois é o seu tempo de vida. Estas células são eliminadas pelos macrófagos do sistema reticuloendotelial na medula óssea e também no fígado e no baço.

Numa anemia hemolítica existe um aumento excessivo da destruição dos eritrócitos. Esta destruição pode ser classificada em intravascular ou extravascular. Numa hemólise intravascular existe uma destruição excessiva dos eritrócitos diretamente na corrente sanguínea, ao contrário da hemólise extravascular que é feita por macrófagos do sistema reticuloendotelial.

As anemias hemolíticas podem classificar-se em hereditárias ou adquiridas. As anemias hemolíticas hereditárias podem ser devido a defeitos da membrana do eritrócito (por exemplo esferocitose hereditária), defeitos no metabolismo do eritrócito (por exemplo devido a deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase) ou anomalias genéticas da hemoglobina (Bridges e Pearson, 1986).

As anemias hemolíticas adquiridas podem ter origem em reações imunológicas (autoimunes ou aloimunes) ou induzidas por fármacos (Naik, 2015).

Os dados laboratoriais destas anemias apresentam aumento da bilirrubina sérica, aumento do urobilinogénio e aumento dos reticulócitos (Heffner, Cavanagh e Nolan, 2019).

### **7.5.4. Anemia Normocítica**

Designa-se por anemia normocítica quando o VCM está dentro dos valores recomendados. De entre as causas de uma anemia normocítica estão hemorragia aguda, doença inflamatória crónica ou doença renal. Esta classificação de anemia pode evoluir para uma anemia microcítica ou então para uma anemia macrocítica, apesar de ser menos frequente. Esta anemia também é caracterizada por um RDW elevado (Woodcock, 1990).

## 7.6. Provas de Hemostase

A hemostase é um processo complexo e estritamente regulado. É um conjunto de mecanismos que contribuem para rapidamente parar a hemorragia, atuando localmente, e de modo autolimitado, de forma a não comprometer o normal fluxo sanguíneo. Quando este equilíbrio sofre perturbações pode ser necessária intervenção clínica (Favaloro, Emmanuel; Lippi, 2017).

O sistema hemostático é um equilíbrio entre mecanismos pró-coagulantes e anticoagulantes, cúmplice de um processo de fibrinólise. Os principais componentes envolvidos são plaquetas, fatores de coagulação, inibidores da coagulação, componentes fibrinolíticos e os vasos sanguíneos.

Este processo normalmente é dividido em três fases: hemostase primária, hemostase secundária ou coagulação e fibrinólise.

A hemostase primária começa logo após o dano endotelial. Compreende na formação de um coágulo sanguíneo ou trombo plaquetar e tem por objetivo parar a hemorragia que ocorre quando a parede de um vaso é danificada. Este trombo é um aglomerado de plaquetas que se forma em torno do local da lesão.

A hemostase secundária é obtida quando a fibrina (formada pela coagulação do sangue) adere aos aglomerados de plaquetas já formados. Depois da lesão vascular, a formação de fator VII ativado (VIIa), fator tecidual (TF), plaquetas e  $Ca^{2+}$  inicia a cascata de coagulação. A agregação de plaquetas acelera o processo de coagulação pois estão a ser fornecidos constantemente fosfolípidos à membrana. A trombina formada no local da lesão converte o fibrinogénio em fibrina e esta estimula a agregação e a secreção de plaquetas. Ativa também os fatores XI e XII e os cofatores V e VIII. A fibrina aumenta à medida que há lise das plaquetas.

A fibrinólise é o processo onde o coágulo gerado pelas fases anteriores é destruído para permitir o reparo do dano do vaso sanguíneo. Este mecanismo requer um grande número de proteínas (ativadoras e inibidoras) produzidas essencialmente pelo fígado, endotélio vascular e plaquetas (DeLoughery, 2015).

No laboratório Fernão Magalhães o mecanismo da hemostase é avaliado através do Sysmex Ca-620. Este aparelho utiliza o método de deteção foto-ótica de coágulos. Utiliza uma luz vermelha para iluminar a mistura de plasma/reagente da amostra e o aparelho deteta as alterações na intensidade da luz dispersa devido a uma maior turvação à medida que o

fibrinogênio é convertido em fibrina. É apenas feita a avaliação do tempo de protrombina (PT), do tempo de tromboplastina parcialmente ativado (aPTT) e realizado o cálculo do INR (do inglês, “*Internacional Normalized Ratio*”).

### **7.6.1. Tempo de Protrombina e INR**

O tempo de protrombina (PT) mede o tempo de coagulação na presença de uma concentração ótima de extrato tecidual (tromboplastina tecidual) e indica a eficiência global da “Via Extrínseca” (deficiência do fator VII, II, V, X e fibrinogênio). É o principal parâmetro utilizado na clínica para controle de doentes com problemas na coagulação. O plasma é incubado a 37°C e posteriormente é adicionado reagente.

Como existem diversos laboratórios a usar reagentes com uma grande variabilidade de sensibilidade recorre-se ao INR para normalizar os efeitos dessa variabilidade de sensibilidade. O INR é um método de padronização dos tempos de protrombina obtidos de diferentes laboratórios. É obtido através da razão entre o tempo de protrombina do paciente e o tempo de protrombina do controlo elevando tudo isto ao Índice Internacional de Sensibilidade (ISI):  $\left(\frac{PT(\text{paciente})}{PT(\text{padrão})}\right)^{ISI}$ . O ISI é conhecido para cada reagente utilizado pelo laboratório para medir o tempo de protrombina. Os valores de INR para doentes sob medicação com anticoagulantes orais devem situar-se entre 2 e 3. Abaixo do valor mínimo há a possibilidade de ocorrer a formação de trombos mais facilmente e acima do valor máximo há o risco de hemorragia. Para indivíduos saudáveis os valores de INR situam-se entre 0,9 e 1,2 (Arachchillage, Vipond e Laffan, 2019).

O valor de INR aumenta no caso de deficiência dos fatores I, II, V, VII e X, deficiência de vitamina K, doenças hepáticas ou com a toma de anticoagulantes (Allison, 2011).

### **7.6.2. Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativado**

O tempo de tromboplastina parcialmente ativado (aPTT) mede a integridade dos fatores de coagulação da “via intrínseca” (fatores VIII, IX, XI e XII) e da via comum (Favaloro, Emmanuel; Lippi, 2017). Para avaliar este parâmetro é necessário adicionar ao plasma um ativador de superfície de fosfolípidos e cálcio, para permitir que ativem a cascata de coagulação e a formação do coágulo. O reagente utilizado é adicionado ao plasma. Esta mistura é incubada e posteriormente é adicionado o cálcio, assim se desencadeia a cascata de coagulação e regista-se o tempo que o plasma demora a coagular. Os valores de referência são entre os 30 e 40

segundos. O aPTT pode encontrar-se alterado em situações de deficiência dos fatores I, II, V, VIII, IX, X, XI, XII, doença hepática, anticoagulantes orais e terapêuticas feitas com heparina (DeLoughery, 2015).

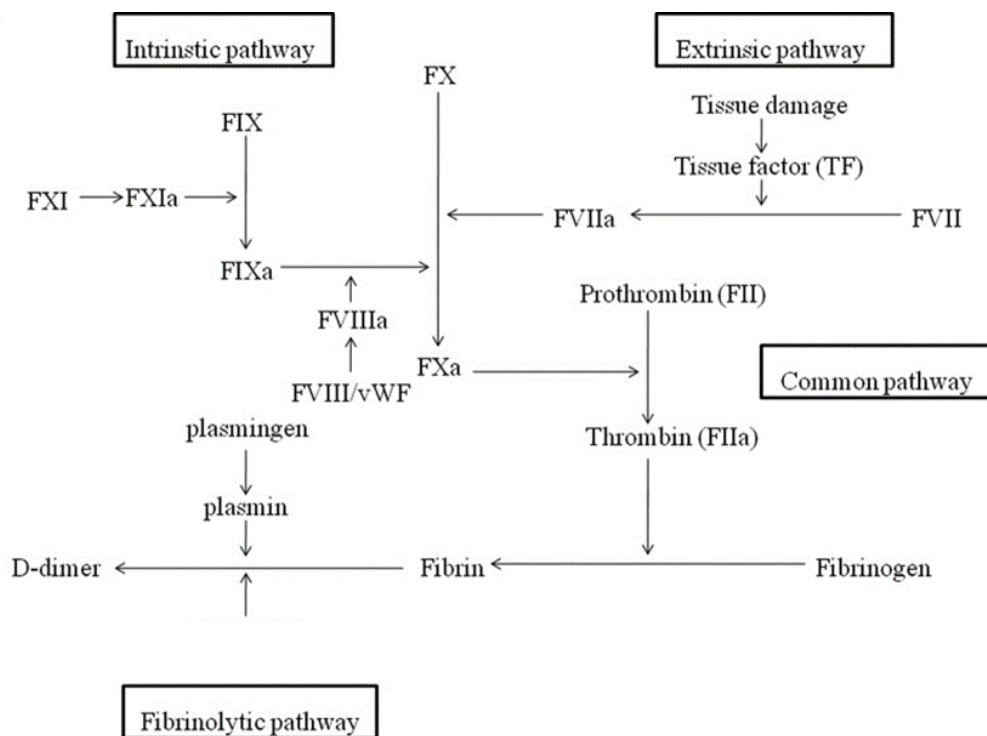


Figura 22- Modelo de Cascata de Coagulação (Shan et al., 2013).

### 7.7. Velocidade de Sedimentação

A velocidade de sedimentação do sangue é a velocidade com que os glóbulos vermelhos sedimentam no fundo de uma suspensão de plasma sanguíneo. Pode estar aumentada quando os níveis de certas proteínas do plasma aumentam, situações associadas a doenças reumáticas, infecções crônicas e doenças malignas.

O método utilizado para medir a velocidade de sedimentação foi proposto em 1921 por Westergren. Consiste na utilização de uma pipeta de Westergren com uma graduação de 0 a 200 mm, com um diâmetro de 20,5 mm e capacidade de 1 ml. A pipeta é cheia com sangue total e colocada na vertical durante 1 hora. Ao fim desse tempo é feita a leitura dos resultados que correspondem à medição da altura de plasma livre das células. O resultado é dado em mm/hora (Lapić et al., 2019).

No laboratório Fernão Magalhães esta análise é feita através de métodos automatizados. Utiliza-se o Ves-Matic 30 e tem como fundamento a utilização do método de Westergren modificado. A velocidade de sedimentação é determinada por sensores que fazem a leitura automática do nível de sedimentação globular. Os resultados são obtidos ao fim de 30 minutos e correspondem aos mesmos resultados obtidos ao fim de 1 hora pelo método manual (Método de Westergren).

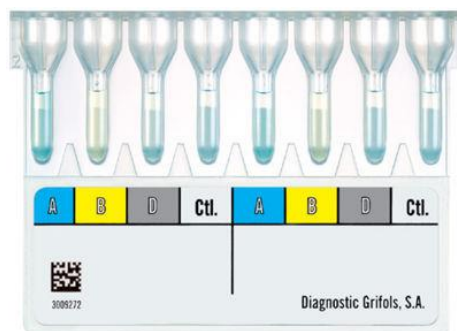
## **7.8. Determinação do Grupo Sanguíneo**

O sistema AB0 foi o primeiro sistema de grupo sanguíneo descoberto em 1901 por Karl Landsteiner. Este sistema é definido pela manifestação de antígenos A e/ou B nos glóbulos vermelhos e pela presença ou ausência de anticorpos anti-A e/ou anti-B no plasma. Para efetuar o teste do grupo sanguíneo Rh é necessário utilizar um reagente anti-D (Hoffbrand e Moss, 2013).

É importante identificar os antígenos presentes nos glóbulos vermelhos e para isso no laboratório Fernão Magalhães utiliza-se um kit DG Gel Confirm Grifols. A técnica utilizada pelo kit baseia-se na aglutinação dos eritrócitos. Consiste em cartas compostas por microtúbulos. Em cada microtúbulo estão presentes anticorpos A, B e D respetivamente (Figura 23).

É necessário fazer uma diluição em solução salina isotónica do sangue total a utilizar e após a diluição são colocados 18 µl em cada microtúbulo, posteriormente tem de se centrifugar. A aglutinação ocorre quando os antígenos dos glóbulos vermelhos reagem com os anticorpos correspondentes, presentes na coluna de gel inserida em cada microtúbulo. A coluna de gel atua como um filtro pois impede glóbulos vermelhos aglutinados passarem através da coluna de gel durante a centrifugação da carta. A coluna de gel separa glóbulos vermelhos aglutinados de glóbulos vermelhos não aglutinados com base no tamanho. Os glóbulos vermelhos aglutinados ficam no topo do gel enquanto que os que não aglutinam ficam no fundo. Se houver aglutinação significa que está presente o antígeno que lhe é específico.

O grupo sanguíneo é determinado segundo os critérios apresentados na Tabela 6 e 7.



**Figura 23- Cartas do kit para a determinação do grupo sanguíneo compostas por microtúbulos.**

**Tabela 6- Interpretação do Grupo AB0**

<b>Microtubo A</b>	<b>Microtubo B</b>	<b>Grupo AB0</b>
Aglutina	Não aglutina	<b>A</b>
Não aglutina	Aglutina	<b>B</b>
Aglutina	Aglutina	<b>AB</b>
Não aglutina	Não aglutina	<b>0</b>

**Tabela 7- Interpretação do Grupo Rh**

<b>Microtubo D</b>	<b>Microtubo Controlo</b>	<b>Grupo Rh</b>
Aglutina	Não aglutina	Positivo
Não aglutina	Não aglutina	Negativo

## **8. Fase Pós- Analítica**

A validação dos resultados é um processo que passa por duas etapas: a validação analítica e a validação biopatológica.

Compete aos técnicos que realizam as diversas análises realizar a validação analítica dos resultados segundo os critérios estabelecidos. Tem de se ter em conta os dados do utente e o bom funcionamento dos aparelhos para validar os resultados.

A validação biopatológica é apenas responsabilidade do especialista do laboratório e tem em conta a interligação dos dados do utente com os valores obtidos e as terapêuticas utilizadas. É importante recolher o máximo de informação possível sobre o utente para assim puder interpretar da melhor maneira os resultados obtidos e fazer uma correta validação dos dados.

## **9. Controlo de Qualidade Externo**

É muito importante garantir resultados de qualidade no laboratório de Análises Clínicas.

Para atingir elevados níveis de qualidade devem seguir-se as boas práticas profissionais. O Laboratório Fernão Magalhães realiza controlos externos nacionais e internacionais (NEQAS, RIQAS, AEFA). Estes programas são aplicados a todas as áreas do laboratório: Bioquímica, Imunologia/Endocrinologia, Hematologia e Microbiologia.

A participação em processos de Avaliação Externa da Qualidade constitui uma ferramenta imprescindível no âmbito do Controlo de Qualidade Analítica implementado no laboratório. Esta avaliação consiste no envio, para cada laboratório, amostras controlo e de casos desconhecidos. Estas amostras são analisadas em conjunto com as amostras dos utentes do laboratório e os resultados obtidos são enviados para se proceder à avaliação.

## **10. Conclusão**

A realização do estágio curricular é uma grande oportunidade para conciliar todos os conhecimentos adquiridos, ao longo dos dois anos do Mestrado em Análises Clínicas, com o real funcionamento do laboratório.

O contacto com a rotina laboratorial e com os profissionais de saúde responsáveis pelos serviços contribuiu para um melhor entendimento da realidade associada ao laboratório clínico, assim como a aquisição de conhecimentos a nível dos princípios dos métodos analíticos, dos equipamentos utilizados nos ensaios, da interpretação de dados laboratoriais e dos procedimentos empregados para garantir a qualidade dos serviços prestados.

No decorrer do estágio tive a oportunidade de acompanhar todo o procedimento analítico, desde a colheita da amostra até à validação dos resultados. Permitiu adquirir uma visão global e compreender a importância clínica de um laboratório de análises clínicas.

Considero que os principais objetivos propostos do estágio foram atingidos, nomeadamente os conhecimentos adquiridos num contexto de trabalho, o contacto com outros profissionais de saúde e a integração no meio profissional. Foi uma experiência muito enriquecedora.





## 11. Bibliografia

- ABEL, Alex M. *et al.* - Natural killer cells: Development, maturation, and clinical utilization. **Frontiers in Immunology**. ISSN 16643224. 9 (2018) 1–23. doi: 10.3389/fimmu.2018.01869.
- ALLISON, Robin W. - **Diagnostic Hematology**. (2011). ISBN 9781848002821.
- ANTONIANI, Chiara; ROMANO, Oriana; MICCIO, Annarita - Concise Review: Epigenetic Regulation of Hematopoiesis: Biological Insights and Therapeutic Applications. **Stem Cells Translational Medicine**. ISSN 21576580. 6 (2017) 2106–2114. doi: 10.1002/sctm.17-0192.
- ARACHCHILLAGE, Deepa R. J.; VIPOND, Lisa; LAFFAN, Mike - Limitations on point care APTT for monitoring of unfractionated heparin in intensive care patients. **Thrombosis Research**. ISSN 00493848. 181 (2019) 124–126. doi: 10.1016/j.thromres.2019.07.029.
- BACHMEYER, C. *et al.* - Vegan diet as a neglected cause of severe megaloblastic anemia and psychosis. **The American Journal of Medicine**. ISSN 00029343. (2019). doi: 10.1016/j.amjmed.2019.06.025.
- BIOMÉRIUX - **chromID Strepto B** [Em linha], atual. 2018. [Consult. 26 jun. 2019]. Disponível em: [www.biomerieux.pt/produto/chromid-strepto-b](http://www.biomerieux.pt/produto/chromid-strepto-b)
- BOOTHBY, Mark R.; HODGES, Emily; THOMAS, James W. - Molecular regulation of peripheral B cells and their progeny in immunity. **Genes and Development**. ISSN 15495477. 33 (2019) 26–48. doi: 10.1101/gad.320192.118.
- BRIDGES, Kenneth;; PEARSON, Howard - **Anemias and Other Red Cell Disorders**. (1986). ISBN 0071593128.
- BUNNEY, P. E., ZINK, A. N., HOLM, A. A., BILLINGTON, C. J., & KOTZ, C. M. - Monocyte-mediated Defense against Bacteria, Fungi and Parasites. **Physiology & behavior**. 176(2017) 139–148. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
- CHAUX, C. *et al.* - Comparison of three chromogenic agar plates for isolation and identification of urinary tract pathogens. **Clinical Microbiology and Infection**. ISSN 1198743X. 8 (2002) 641–645. doi: 10.1046/j.1469-0691.2002.00433.x.
- CHIRUMBOLO, Salvatore *et al.* - The role of basophils as innate immune regulatory cells in allergy and immunotherapy. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**. ISSN 2164554X. 14 (2018) 815–831. doi: 10.1080/21645515.2017.1417711.

CHULILLA, Jose Antonio Moreno; COLÁS, Maria Soledad Romero; MARTÍN, Martín Gutiérrez - Classification of anemia for gastroenterologists. **World Journal of Gastroenterology**. ISSN 10079327. 15 (2009) 4627–4637. doi: 10.3748/wjg.15.4627.

CRABB, Helen Kathleen *et al.* - Traditional Salmonella Typhimurium typing tools (phage typing and MLVA) are sufficient to resolve well-defined outbreak events only. **Food Microbiology**. ISSN 10959998. 84 (2019) 103237. doi: 10.1016/j.fm.2019.06.001.

DELOUGHERY, Thomas - **Hemostasis and Thrombosis**. Third Edit ed. Springer, 2015. ISBN 978-3-319-09311-6.

DHINGRA, Neelam *et al.* - Diretrizes da OMS para a tiragem de sangue: boas práticas em flebotomia. **Organização Mundial da Saúde**. (2009).

DOLAT, Lee; VALDIVIA, Raphael H. - A renewed tool kit to explore Chlamydia pathogenesis: from molecular genetics to new infection models. ISSN 2046-1402. (2019) 935. doi: 10.12688/f1000research.18832.1.

ERASO, Elena *et al.* - Evaluation of the new chromogenic medium candida ID 2 for isolation and identification of *Candida albicans* and other medically important *Candida* species. **Journal of Clinical Microbiology**. ISSN 00951137. 44 (2006) 3340–3345. doi: 10.1128/JCM.00213-06.

FAVALORO, EMMANUEL; LIPPI, Giuseppe - **Hemostasis and Thrombosis Methods and Protocols**. ISBN 978-1-4939-7194-7.

FONSECA, Ana Bruschy *et al.* - Programa Nacional de Controlo de Infecção - Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em Bacteriologia. **Ministério da Saúde Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge**. (2004) 52.

GEORGE, Moura - DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE. (2012) 1–15.

GONZÁLEZ-ALONSO, José *et al.* - Erythrocytes and the regulation of human skeletal muscle blood flow and oxygen delivery: Role of erythrocyte count and oxygenation state of haemoglobin. **Journal of Physiology**. ISSN 00223751. 572 (2006) 295–305. doi: 10.1113/jphysiol.2005.101121.

GREEN, P. T. - Red cell indices. **Manitoba medical review**. ISSN 00252255. 30 (1950) 371–372.

HEFFNER, Geoff G.; CAVANAGH, Amanda; NOLAN, Benjamin - Successful management of acute bilirubin encephalopathy in a dog with immune-mediated hemolytic anemia using therapeutic plasma exchange. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**. ISSN 1479-3261. 2017 (2019) doi: 10.1111/vec.12876.

HOFFBRAND, A. Victor; *et al.* - **Color Atlas of Clinical Hematology Molecular and Cellular Basis of Disease**. 1th editio ed.

HOFFBRAND, A. Victor; MOSS, P. A.- **Fundamentos em Hematologia**. 6th editio ed. ISBN 9781405198905.

**INSTITUTO PORTUGUÊS DE ACREDITAÇÃO** - [Em linha] [Consult. 28 abr. 2019]. Disponível em: [www.ipac.pt](http://www.ipac.pt)

JIMENEZ, Kristine; KULNIGG-DABSCH, Stefanie; GASCHÉ, Christoph - Management of iron deficiency Anemia. **Gastroenterology and Hepatology**. ISSN 15547914. 11 (2015) 241–250.

JOSÉ BARBAS RODRIGUES, Francisco; PAULA DIAS BARROSO, Ana - Etiologia e sensibilidade bacteriana em infecções do tracto urinário. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**. ISSN 08709025. 29 (2012) 123–131. doi: 10.1016/s0870-9025(11)70016-5.

KANG, Haiquan *et al.* - Dissemination of Multidrug-Resistant *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* with Class 1, Class 2, and Atypical Class 1 Integrons in China . **Microbial Drug Resistance**. ISSN 1076-6294. (2019) 1–10. doi: 10.1089/mdr.2018.0229.

KOTTKE-MARCHANT, Kandice; DAVIS, Bruce - **Laboratory Hematology Practice**. Wiley Blackwell, 2012

LAPIĆ, Ivana *et al.* - Automated measurement of the erythrocyte sedimentation rate: Method validation and comparison. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. ISSN 14374331. (2019). doi: 10.1515/cclm-2019-0204.

LEVICAN, Arturo *et al.* - Genomic Analysis of Chilean Strains of *Campylobacter jejuni* from Human Faeces . **BioMed Research International**. ISSN 2314-6133. (2019) 1–12. doi: 10.1155/2019/1902732.

LOKTIONOV, Alexandre - Eosinophils in the gastrointestinal tract and their role in the pathogenesis of major colorectal disorders. **World Journal of Gastroenterology**. ISSN 1007-9327. 25 (2019) 3503–3526. doi: 10.3748/wjg.v25.i27.3503.

MA, Qiang *et al.* - Interactions between human hemoglobin subunits and peroxiredoxin 2. **Frontiers in Bioscience - Landmark**. ISSN 10934715. 24 (2019) 1085–1096. doi: 10.2741/4770.

MAHON, Connie; LEHMAN, Donald - **Diagnostic Microbiology**. Sixth Edit ed. ISBN 978-0-323-48218-9.

MASKOEN, Ani Melani *et al.* - Shine & Lal index as a predictor for early detection of  $\beta$  - thalassemia carriers in a limited resource area in Bandung, Indonesia. (2019) 1–6.

MIMA, Kosuke *et al.* - The role of intestinal bacteria in the development and progression of gastrointestinal tract neoplasms. **Surgical Oncology**. ISSN 18793320. 26 (2017) 368–376. doi: 10.1016/j.suronc.2017.07.011.

MORO-GARCÍA, Marco A. *et al.* - Influence of inflammation in the process of T lymphocyte differentiation: Proliferative, metabolic, and oxidative changes. **Frontiers in Immunology**. ISSN 16643224. 9 (2018). doi: 10.3389/fimmu.2018.00339.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S. - **Microbiologia Médica**. Elsevier Health Sciences Brazil. (2014). ISBN 978-85-352-7978-8.

NAIK, Rakhi - Warm Autoimmune Hemolytic Anemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**. ISSN 15581977. 29 (2015) 445–453. doi: 10.1016/j.hoc.2015.01.001.

NGUYEN, Thi Huong *et al.* - Rupture Forces among Human Blood Platelets at different Degrees of Activation. **Scientific Reports**. ISSN 20452322. 6 (2016) 1–12. doi: 10.1038/srep25402.

ORDEM DOS FARMACÊUTICOS E ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DE ANALISTAS CLÍNICOS - **Normas para o Laboratório Clínico** [Em linha] [Consult. 28 abr. 2019].

Disponível em:

[www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/normas\\_para\\_o\\_laboratorio\\_clinico\\_3a\\_edicao\\_nlc2015\\_14176588915ab15cee05539.pdf](http://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/normas_para_o_laboratorio_clinico_3a_edicao_nlc2015_14176588915ab15cee05539.pdf)

ORIGA, Raffaella; MOI, Paolo - Alpha-Thalassemia Summary Genetic counseling. (2019) 1–25.

PAIRET, Bruno; JAENICKE, Elmar - Structure of the altitude adapted hemoglobin of guinea pig in the R2-state. **PLoS ONE**. ISSN 19326203. 5 (2010). doi: 10.1371/journal.pone.0012389.

PARK, Sunmi *et al.* - Monocyte recruitment and activated inflammation are associated with thyroid carcinogenesis in a mouse model. 9 (2019) 1439–1453.

SAÚDE, Direção-Geral Da; DIVISÃO DE SAÚDE MATERNA, Infantil E Dos Adolescentes - **Saúde Reprodutiva DOENÇAS INFECIOSAS E GRAVIDEZ** [Em linha]. (2000). Disponível em: [www.saudereprodutiva.dgs.pt/normas-e-orientacoes/gravidez/orientacao-tecnica-nl1-pdf.aspx](http://www.saudereprodutiva.dgs.pt/normas-e-orientacoes/gravidez/orientacao-tecnica-nl1-pdf.aspx)

SCARPARO, C. *et al.* - Comparative evaluation of two commercial chromogenic media for detection and presumptive identification of urinary tract pathogens. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. ISSN 09349723. 21 (2002) 283–289. doi: 10.1007/s10096-002-0718-0.

SILVA, Paulo Henrique Da *et al.* - **Hematologia Laboratorial: Teoria e Procedimentos**. ISBN 858271260X.

SPRINGUEL, Lorraine; RENAULD, Jean Christophe; KNOOPS, Laurent - JAK kinase targeting in hematologic malignancies: A sinuous pathway from identification of genetic alterations towards clinical indications. **Haematologica**. ISSN 15928721. 100 (2015) 1240–1253. doi: 10.3324/haematol.2015.132142.

STREIGHT, Kaitlyn L.; PARANAL, Ronald M.; MUSER, Daniel M. - The oral manifestations of syphilitic disease: a case report. **Journal of Medical Case Reports**. ISSN 1752-1947. 13 (2019) 227. doi: 10.1186/s13256-019-2171-z.

TROTTA, Aldana *et al.* - Platelets promote *Brucella abortus* monocyte invasion by establishing complexes with monocytes. **Frontiers in Immunology**. ISSN 16643224. 9 (2018). doi: 10.3389/fimmu.2018.01000.

TURGEON, Mary L.; TURGEON, M. L. - **Clinical hematology: Theory and procedures**. Third edition. ISBN 0-316-85623-1.

VANHAREN, Marion; GIRARD, Denis - Activation of Human Eosinophils with Nanoparticles: a New Area of Research. **Inflammation**. ISSN 0360-3997. (2019). doi: 10.1007/s10753-019-01064-4.

WANG, Hai; PAN, Li; LIU, Zheng - Neutrophils as a Protagonist and Target in Chronic Rhinosinusitis. (2019).

WOODCOCK, B. - **Atlas of Clinical Hematology**. ISBN 9781496396594.

YILMAZ, Sedat - The Spectrum of  $\beta$ -Thalassemia Mutations in Siirt Province, Southeastern Turkey. **Hemoglobin**. ISSN 0363-0269. (2019) 1–8. doi: 10.1080/03630269.2019.1647852.

ZHENG, Xin Ting; TAN, Yen Nee - Development of Blood-Cell-Selective Fluorescent Biodots for Lysis-Free Leukocyte Imaging and Differential Counting in Whole Blood. **Small**. ISSN 1613-6810. (2019) 1903328. doi: 10.1002/smll.201903328.

## Anexos

### Anexo I. Tabela de Valores de Referência Utilizados no Laboratório Fernão Magalhães.

Parâmetros		Valores de Referência
Eritrócitos	Homens	4,5-5,9×10 <sup>12</sup> /L
	Mulheres	4,1-5,1×10 <sup>12</sup> /L
Hemoglobina	Homens	140-175 g/L
	Mulheres	120-153 g/L
Hematócrito	Homens	0,45-0,50 L/L
	Mulheres	0,36-0,45 L/L
VCM	Adultos	80-95 fL
HCM	Adultos	27-33 pg
CHCM	Adultos	300-350 g/L
RDW	Adultos	11,6-14 %
Leucócitos	Adultos	4,0-10,0×10 <sup>9</sup> /L
Neutrófilos	Adultos	2,0-7,0×10 <sup>9</sup> /L
Linfócitos	Adultos	1,0-3,0×10 <sup>9</sup> /L
Monócitos	Adultos	0,2-1,0×10 <sup>9</sup> /L
Eosinófilos	Adultos	0,02-0,5×10 <sup>9</sup> /L
Basófilos	Adultos	0,02-0,1×10 <sup>9</sup> /L
Plaquetas	Adultos	150-400×10 <sup>9</sup> /L