



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Filipa de Oliveira Moreira

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

**Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas,
orientado pela Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa e pelo
Doutor António Ferreira Neves e apresentado à Faculdade de Farmácia da
Universidade de Coimbra**

outubro de 2020



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Filipa de Oliveira Moreira

Relatório de Estágio
Mestrado em Análises Clínicas

**Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas,
orientado pela Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa e pelo
Doutor António Ferreira Neves e apresentado à Faculdade de Farmácia da
Universidade de Coimbra**

Outubro de 2020

Agradecimentos

O maior agradecimento é aos meus pais, por tudo o que fizeram por mim durante todos estes anos, os sacrifícios, a compreensão, a paciência, tudo, são o meu maior apoio. Agradecer também ao resto da minha família, avós, tios, padrinho e afilhado, e um agradecimento especial ao meu avô por tudo o que fez por mim durante estes anos.

Aos meus amigos, em especial aos meus Patuscos e à Beatriz por me terem apoiado sempre e estarem sempre lá para mim quando precisei.

Um agradecimento também ao laboratório Avelab por me ter proporcionado a realização do estágio, na pessoa do Dr. António e a todos os colaboradores por terem contribuído no sucesso do estágio, em particular à Esther, a Fátima, ao senhor José.

Por último, um agradecimento especial à Professora Doutora Maria do Céu Sousa pela orientação na realização deste relatório.

Obrigada!

Índice	
Abreviaturas	9
Resumo	11
Abstract	11
1. Introdução	13
2. Caracterização do laboratório de estágio	14
3. Processamento de amostras	15
3.1. Fase pré-analítica.....	15
3.2. Fase analítica	16
3.3. Fase pós-analítica	16
4. Controlo de qualidade	17
4.1. Controlo de qualidade interno.....	17
4.2. Controlo de qualidade externo	17
5. Bioquímica	18
5.1. Amostras	18
5.2. Equipamentos	18
5.3. Manutenção, controlo de qualidade e calibração.....	18
5.4. Resultados	19
6. Imunologia	19
7. Microbiologia	20
7.1. Equipamentos	20
7.1.1. Aution Max Ax-4030	20
7.1.2. Phoenix.....	21
7.2. Controlo de qualidade	21
7.3. Análises microbiológicas	21
7.3.1. Urianálise	22
7.3.2. Análise fezes.....	30
7.3.3. Exsudato vaginal	32
7.3.4. Infecções do trato respiratório	34
7.3.5. Confirmação fenotípica de ESBL.....	36
7.3.6. Pesquisa de enterobactérias produtoras de carbapenemases	36
7.3.7. Serologia infecciosa	37
7.3.8. Espermograma.....	40
8. Hematologia	42
8.1. Hemograma	42
8.1.1. Sysmex-XE2100 e Sysmex-XT2000i	43
8.2. Velocidade de sedimentação	44

8.2.1. STARRSED Compact.....	44
8.3. Hemoglobina glicada A1c (HA1c).....	44
8.3.1. ADAMS A1c HA-8180V e ADAMS A1c HA-8180T.....	45
8.4. Estudo morfológico do sangue periférico	45
8.4.1. Coloração de May-Grünwald-Giemsa	45
8.5. Casos Clínicos	46
8.5.1. Anemia	46
8.5.2. Leucemia mieloide crónica.....	48
8.6. Hemostase e coagulação	50
8.6.1. Equipamento STA Compact Max Systems	51
8.6.2. Doenças da coagulação – doentes hipocoagulados.....	52
8.6.3. Grupos sanguíneos.....	52
8.6.4. Coombs direto e indireto	53
9. Conclusão	55
10. Bibliografia	56
11. Anexos	60

Índice de Figuras

Figura 1 - Aution Max Ax-4030.....	20
Figura 2 - Phoenix 100.....	21
Figura 3 - Observação de colónias bacterianas em meio de cultura CHROMOagar Orientation.....	28
Figura 4 - Colónias de <i>S. agalactiae</i> em meio Granada.....	33
Figura 5 - Observação microscópica de "clue cells" numa coloração de Gram.	34
Figura 6 - Teste VDRL positivo	37
Figura 7 - THPA positivo e negativo	38
Figura 8 - Esquema ilustrativo do teste serológico da SARS-CoV-2-IgM-IgG	39
Figura 9 - Coloração de May-Grünwald-Giemsa de um esfregaço sanguíneo.....	46
Figura 10 - Esfregaço sanguíneo corado por May-Grünwald-Giemsa	48
Figura 11 - Esfregaço sanguíneo corado por May-Grünwald-Giemsa.	49
Figura 12 - Cascata da coagulação	50

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Métodos analíticos e respetivas análises do equipamento Aution Max Ax-4030	20
Tabela 2 - Cristais presentes nos vários tipos de urina	24
Tabela 3 - Seleção dos meios de cultura na análise bacteriológica de urina.....	28
Tabela 4 - Microrganismos produtores de carbapenemas	37
Tabela 5 - Hemograma	47
Tabela 6 - Hemograma	49
Tabela 7 - Grupos sanguíneos.....	53

Abreviaturas

Ac – anticorpo

AFP – alfa-I fetoproteína

Ag – antigénio

ATCC – *American Type Culture Collection*

Beta-hCG – gonadotrofina coriónica humana

BK – Bacilo de Koch

CA 125 – marcador tumoral

CEA – antigénio carcinoembrionário

CMV – Citomegalovírus

COVID-19 – Coronavírus Disease

DGS – Direção Geral da Saúde

DHEA-S – dihidroepiandrosterona-sulfato

ESBL – β -lactamases de espectro alargado

FSH – hormona foliculoestimulante

FT3 – Triiodotironina livre

FT4 – tiroxina livre

HBc – antigénio do core do vírus da hepatite B

HBe – antigénio e do vírus da hepatite B

HBs – antigénio de superfície do vírus da hepatite B

HIV – vírus da imunodeficiência humana

Ig – imunoglobulina

LH – hormona luteínica

MRSA – *Staphylococcus aureus* metilina resistentes

PSA – antigénio específico da próstata

PTH – paratormona

RT-PCR – reação de polimerase em cadeia em tempo real

SARS-CoV-2 – Síndrome Respiratória Aguda Grave – Coronavírus – 2

T3 – triiodotironina total

T4 – tiroxina total

TPHA – *Treponema pallidum Hemagglutination Assay*

TSH – hormona tiroestimulante

VDRL – *Veneral Disease Research Laboratory*

VRSA - *Staphylococcus aureus* vancomicina resistentes

Resumo

A elaboração do presente relatório de estágio no âmbito do mestrado de análises clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra tem como objetivo descrever as atividades desenvolvidas ao longo do estágio no laboratório AVELAB. Serão abordados os procedimentos pré-analíticos, analíticos, pós-analíticos, o controlo de qualidade e a validação de todas as áreas existentes no laboratório. As áreas Microbiologia e a Hematologia serão descritas mais pormenorizadamente.

Palavras-chave: Análises Clínicas, Hematologia, Microbiologia, Urocultura, Sangue .

Abstract

The purpose of this internship report within the framework of the Clinical Analysis Master's degree of the Pharmacy College of the University of Coimbra is to describe the activities developed throughout it in the AVELAB laboratory. It will address pre-analytical, analytical, post-analytical procedures, quality control and validation of all areas existing in the laboratory. The Microbiology and Hematology will be described in more detail will be.

Keywords: Clinical Analysis, Hematology, Microbiology, Uroculture, Blood.

I. Introdução

O Mestrado de Análises Clínicas, para além da sua componente letiva teórica e laboratorial, proporciona aos seus alunos um estágio profissional que permite a interligação dos conhecimentos teóricos com a prática diária de um laboratório de diagnóstico clínico.

O estágio confere competências laboratoriais em todas as áreas indispensáveis ao diagnóstico, Hematologia, Microbiologia, Bioquímica e Imunologia bem como a todo o processo envolvente, desde os procedimentos pré-analíticos até à validação dos resultados, passando ainda pelo controlo de qualidade em todas as fases, pré-analítica, analítica e pós-analítica e pela implementação de novas técnicas. De facto, é nos permitido estar em contacto com a rotina diária do laboratório e por consequência aprender todo o processo analítico para que os resultados sejam obtidos com a maior fiabilidade possível.

Os laboratórios de análises clínicas são indispensáveis ao diagnóstico, prevenção e monitorização de doenças e da sua respetiva terapêutica, permitindo melhorar a qualidade de vida das populações.

A par da evolução científica e tecnológica, os laboratórios também têm evoluído, tornando-se cada vez mais automatizados, permitindo assim diminuir erros de operador e fornecer resultados com maior rapidez. Contudo, todos os processos têm de ser supervisionados e validados pois podem haver resultados que tenham de ser confirmados por técnicas manuais.

Assim, o presente relatório tem como objetivo descrever o estágio realizado por um período de seis meses no laboratório AVELAB – Laboratórios Médicos de Análises Clínicas de Aveiro. O estágio foi dividido por seis áreas: colheitas e triagem, análise sumária de urina e serologia, microbiologia, hematologia, coagulação e imunoquímica, sendo que o tempo de permanência em cada diferiu consoante a sua importância no diagnóstico. As áreas que serão descritas com maior pormenor serão a Microbiologia e a Hematologia.

2. Caracterização do laboratório de estágio

O laboratório AVELAB situa-se na cidade de Aveiro. É um laboratório de análises clínicas de grandes dimensões, possuindo mais de 50 postos de colheita espalhados por toda a região norte e centro do país, permitindo uma maior proximidade com as populações. As colheitas podem ainda ser realizados no domicílio com marcação prévia.

A equipa clínica é constituída por três médicos, Dr. Américo Freitas (Diretor Clínico) é o Dr. Alberto Ferreira Neves e Dra. Teresa Raposo e com dois os farmacêuticos, o Dr. António Ferreira Neves e a Dra. Irene Sá.

O laboratório central presta serviços nas áreas da Hematologia, Bioquímica, Imunologia e Microbiologia. Possui uma sala de receção aos utentes, quatro salas de colheita, uma sala de triagem de amostras, uma área administrativa (informática e contabilidade), gabinetes para a equipa clínica, laboratórios para cada uma das áreas acima referidas e salas de lavagem e desinfeção de materiais. Funciona todos os dias uteis das 7h30 às 19h e aos sábados das 8h às 13h.

O laboratório AVELAB tem convenções com várias entidades públicas e privadas e seguradoras, e efetua análises para lares de idosos, para a Universidade de Aveiro e para gabinetes de Medicina no Trabalho.

Para que todas as amostras cheguem ao laboratório nas melhores condições, o seu transporte é rigoroso e feito em arcas refrigeradas e com o melhor acondicionamento possível.

O laboratório central juntamente com os postos de colheita, têm um fluxo diário de aproximadamente 700 utentes, sendo a Hematologia e a Bioquímica os setores com maior número de amostras.

Todos os serviços estão informatizados, desde a receção até à validação dos resultados. Os equipamentos utilizados na análise das amostras estão ligados a uma rede de computadores, passando diretamente os resultados para o sistema informático, que no caso do AVELAB é o Appolo 3, o que permite rastrear as amostras, desde que entram no laboratório até que saia o resultado.

3. Processamento de amostras

As amostras desde que chegam ao laboratório até que sai o seu resultado passam por diversas fases de processamento, sendo que a fase mais crítica é a pré-analítica pois é onde ocorrem a maioria dos erros analíticos.

3.1. Fase pré-analítica

Esta é a fase que precede a análise propriamente dita e por norma é a mais manual, pelo que também é a que dá origem a um maior número de erros, 62% segundo alguns autores. Os erros mais comuns são a hemólise das amostras sanguíneas, pedidos incorretos e má identificação das amostras.¹

No Avelab tenta-se ao máximo minimizar estes erros, começando logo na admissão dos utentes no laboratório. Neste primeiro processo são introduzidas as análises a realizar no sistema e é de imediato definido um código de processo que irá acompanhar todo o processo de análise. Neste primeiro contato com o utente é explicado, caso necessário, o procedimento para a realização das colheitas, se é preciso o utente estar em jejum ou não, os cuidados a ter na colheita da urina, que difere se é apenas uma análise sumária ou se é bacteriológica.

De seguida, o utente é encaminhado para a sala de colheitas, onde todas as normas de segurança são cumpridas e onde são recolhidas amostras de sangue, zangaratoas vaginais, retais, nasofaríngeas, raspados de unhas, entre outras.

Todas as amostras são identificadas com etiquetas, antes de se proceder a colheita, para que não existam trocas. As etiquetas contêm um código de barras, o nome do utente, o código do processo, que tem 2 letras que correspondem ao local da colheita, quer seja o laboratório central ou um posto de colheita e 5 números identificativos do utente, o setor do laboratório onde vai ser analisada a amostra e a cor da tampa do tubo para o qual é recolhida a amostra.

Posteriormente, as amostras recolhidas são encaminhadas para a sala de triagem e são distribuídas pelos vários setores. As amostras para o setor da bioquímica são triadas e tratadas nesta sala, as restantes, nomeadamente as amostras para a hematologia, as urinas e as amostras para a bacteriologia são triadas nos respetivos setores.

Esta fase de triagem é extremamente importante para diminuir os erros, pelo que todos os cuidados têm de ser tomados para que não haja trocas, verificar se todas as amostras reúnem as condições necessárias para que sejam analisadas, ou seja, verificar se não existem coágulos, colheitas mal feitas, tubos com etiquetas erradas, por exemplo tubos de hematologia que têm

etiquetas de tubos bioquímica, colheitas realizadas para tubos ou recipientes incorretos, entre outros pormenores.

Nesta sala são também retiradas as alíquotas para as análises que são feitas no soro fora do setor da bioquímica ou que são realizadas em laboratórios exteriores, que no caso da Avelab são dois laboratórios espanhóis, Cerba e Ambar, ambos com sede em Barcelona. Para estes laboratórios são enviadas análises que devido ao seu baixo volume diário não justificam o investimento por parte do Avelab, como a análise a catecolaminas, vitamina C, teste respiratório e IgM anti- *Helicobacter pylori*, entre outras. Estas amostras são enviadas cumprindo todas as condições de conservação para que não haja contaminação ou deterioramento das mesmas.²

3.2. Fase analítica

A fase analítica é de todas as fases a mais automatizada em quase todos os setores do laboratório, logo é fase em que os erros são menos frequentes, cerca de 15% do total de todas as fases. Estes erros devem-se essencialmente a interferências no equipamento ou a outros erros de precisão e ainda, mesmo que numa percentagem diminuta, a erros aleatórios.¹

No Avelab, para que estes erros sejam bastante diminutos, os equipamentos são controlados e calibrados diariamente ou quando ocorre mudança de reagentes, para que todas as amostras são analisadas com o maior rigor possível.

3.3. Fase pós-analítica

A fase pós-analítica encerra em si a transmissão dos resultados analíticos ao utente e ao clínico, que vai fazer o diagnóstico ou ajustamento da medicação, consoante a análise realizada e os resultados. Nesta fase também erros são cometidos, sendo que em percentagem é de 23% de todos os erros. Os mais comuns são boletins com resultados incompletos, resultados criticáveis do ponto de vista científico, ou seja, não há concordância entre os resultados e a não comunicação rápida e eficaz ao clínico ou ao utente de resultados que podem pôr em causa a saúde destes.¹

No Avelab são tomadas todas as medidas necessárias para que tais erros não aconteçam. Todas as análises são validadas por duas pessoas diferentes, primeiramente pelo técnico que faz a validação analítica e posteriormente pelo especialista, médico ou farmacêutico que faz a validação biopatológica, garantindo que todos os resultados estão concordantes e que saem no tempo previsto. Em casos graves é comunicado imediatamente ao utente ou ao clínico para que sejam tomadas providências o mais rápido possível.

4. Controlo de qualidade

A garantia da qualidade engloba um conjunto de ações que permitem obter a confiança no serviço prestado pelo laboratório e ter o controlo de todas as ações que levam à qualidade de todas as fases do procedimento analítico.

Para que esta garantia ocorra o laboratório tem de incluir na sua rotina o controlo de qualidade interno (CQI) e externo (CQE).

4.1. Controlo de qualidade interno

O controlo de qualidade interno (CQI) é um processo fundamental para que sejam detetadas irregularidades, para que haja avaliação dos erros e se proceda à sua correção com a maior brevidade possível.

No Avelab, o CQI é realizado diariamente nos vários setores do laboratório antes de se começar a rotina laboratorial de análise das amostras ou quando há mudança no lote de reagentes.

Os fornecedores dos equipamentos fornecem os controlos de qualidade em três níveis diferentes de concentração. Dois destes controlos são analisados, de forma alternada, diariamente. Os resultados obtidos são expressos de forma numérica e gráfica, sendo esta última a mais importante, porque é a partir desta que se forma as cartas de controlo com as regras de Westgard, que indicam que os resultados obtidos não podem ultrapassar mais ou menos dois desvios padrões. Caso esta situação aconteça deve ser investigada a sua causa, proceder-se à respetiva correção e fazer novas calibrações. Após esta resolução, volta-se a analisar os controlos e se já estiverem em conformidade, pode-se prosseguir para a análise das amostras.

4.2. Controlo de qualidade externo

O laboratório para garantir a qualidade tem de estar inscrito em programas de avaliação externa. O Avelab participa em dois programas de avaliação externa, o RIQAS “*Randox International Quality Assessment Scheme*” e o UK NEQAS “*United Kingdom National External Quality Assessment Service*”. O CQE é realizado uma vez por mês em todos os setores do laboratório. Os controlos são tratados como amostras de utentes pois as suas características são desconhecidas. Os resultados obtidos são enviados e analisados pelas duas entidades.

Ao laboratório é reportado o relatório que demonstra se os resultados obtidos eram os esperados e se não o forem tem de ser investigada a causa e resolvida para que possam ser analisadas as amostras na máxima qualidade.^{2,3}

5. Bioquímica

5.1. Amostras

Neste setor do laboratório analisa-se soro e urina, tendo em média um fluxo de amostras de 700/dia, sendo que devido à pandemia COVID-19 esse número reduziu aproximadamente para 500 amostras/dia.

O sangue é colhido para tubos sem anticoagulante, contêm apenas partículas de sílica nas paredes do tubo que favorece a retração do coágulo e um gel que separa o soro da fração globular, evitando, assim, o contato prolongado das duas fações que promove, entre outros, o consumo de glicose pelos eritrócitos.⁴

As amostras rececionadas no laboratório são encaminhadas para a sala de triagem, centrifugadas a 3500 rpm durante 15 minutos, de seguida são retiradas alíquotas, se necessário, e por fim são colocadas nos suportes dos equipamentos.

No caso da urina as análises bioquímicas são normalmente realizadas em urinas de 24h e por isso são retiradas alíquotas para serem analisadas no equipamento.

5.2. Equipamentos

O equipamento utilizado para as análises bioquímicas é o Architect plus ci8200 da Abbott. Este equipamento é composto por dois módulos, o da bioquímica, c8000, e o da imunologia. No laboratório existem dois equipamentos iguais, sendo que o módulo da bioquímica funciona em espelho, ou seja, fazem as mesmas análises.

O módulo c8000 usa métodos fotométricos e turbidimétricos para analisar os parâmetros bioquímicos. Tem ainda integrado um eletrodo seletivo de iões (tecnologia ICT) que permite a obtenção do ionograma.⁵

As eletroforeses das proteínas são realizadas num equipamento diferente, no Capillarys 2 by Sebia.

5.3. Manutenção, controlo de qualidade e calibração

A manutenção dos equipamentos é feita diariamente e de forma automática pelo equipamento. O controlo de qualidade interno é realizado diária e semanalmente. O controlo diário é feito com dois níveis diferentes de concentração, alternado ao longo dos dias. Todas as segundas-feiras é realizado o controlo semanal. Os controlos são fornecidos pela marca do equipamento. Como já referido, o controlo de qualidade externo é realizado uma vez por mês, estando o laboratório inscrito no programa RIQAS.

As calibrações são realizadas apenas quando são emitidos alertas pelo equipamento ou quando há mudança de lote, à exceção do ionograma no soro e na urina e das proteínas e da creatinina na urina que há uma calibração diária.

5.4. Resultados

Normalmente os resultados das análises ficam disponíveis no próprio dia. São validados numa primeira fase pelos técnicos do setor da bioquímica e de seguida pelos médicos ou farmacêuticos especialistas. Só no fim destas duas validações fica disponível o boletim com os resultados.

6. Imunologia

A área da imunologia não tem um setor específico, estando as análises distribuídas pelos vários setores do laboratório.

A maioria das análises imunológicas é realizada no setor da bioquímica já que o equipamento Architec plus ci8200 tem um modulo de imunologia, o Architec i2000SR. O laboratório tem ainda o Architec i1000 que está mais direcionado para o controlo de fármacos, drogas de abuso e recentemente para a quantificação da IgG anti-COVID-19 (Anexo I). Numa sala adjacente à da bioquímica existe um equipamento exclusivo para análises de alérgenos e autoimunidade, o Phadia 250 mas enquanto estagiária não tive qualquer contacto com este equipamento.

7. Microbiologia

A microbiologia é a área das ciências que estuda os microrganismos, bactérias, vírus e parasitas. O objetivo do diagnóstico laboratorial é detectar, identificar e caracterizar os microrganismos que provocam patologias no Homem. A articulação entre o clínico e o laboratório é fundamental para que o diagnóstico seja eficaz e a abordagem terapêutica seja a mais correta.⁷

É neste setor que são detetadas as infeções de origem microbiológica e se faz o estudo de suscetibilidade aos antibióticos de modo a que a terapêutica seja a mais adequada possível ao tipo de microrganismo presente.

No Avelab o setor da microbiologia é o menos automatizado de todos os setores, estando apenas automatizada a identificação, o antibiograma e a análise sumária da urina.

7.1. Equipamentos

No sector da Microbiologia são usados vários equipamentos como centrifugas para obtenção do sedimento urinário, microscópicos, câmaras de fluxo laminar e os equipamentos automáticos, o Aution Max Ax-4030 e o Phoenix.

7.1.1. Aution Max Ax-4030



Figura I - Aution Max Ax-4030

O Aution Max Ax-4030 (Fig. I) é o equipamento utilizado na análise sumária da urina.

É um equipamento automático que utiliza tiras de testes para fazer a análise. São analisados 10 parâmetros: o pH, glicose, proteína, bilirrubina, urobilinogénio, sangue, cetonas, nitritos e leucócitos. É também analisada a cor, a turvação e a densidade da urina. Estes parâmetros são analisados de formas diferentes, estando descritos na Tabela I.⁹

Tabela I - Métodos analíticos e respetivas análises do equipamento Aution Max Ax-4030 (adaptado da bula)

Parâmetro analítico		Método
Tiras teste (10 parâmetros)		Refletância de comprimento de onda duplo (exceção: sangue que é medido num comprimento de onda único).
Cor		Transmissão da luz.
Densidade		Refratometria de reflexão.
Turvação		Dispersão da luz.

7.1.2. Phoenix



Figura 2 - Phoenix 100

O equipamento Phoenix (Fig. 2) é um equipamento automático desenvolvido para identificar espécies bacterianas e realizar testes de sensibilidade das mesmas. Permite identificar espécies clinicamente importantes de forma rápida e com confiança nos resultados.

Este equipamento utiliza painéis combinados, ou seja, o painel é dividido em duas partes permitindo realizar a identificação (ID) e o antibiograma (AST) no mesmo painel.

Os painéis contêm substratos fluorogénios e cromogénios modificados. O lado do ID é composto por substratos bioquímicos secos e dois poços fluorescentes de controlo. O lado AST difere consoante o tipo de painel, pois existem painéis específicos para determinadas famílias de bactérias e antibióticos específicos para cada uma dessas famílias. O método utilizado é o da microdiluição em caldo. O inóculo é ajustado a um padrão de 0,5 McFarland são retirados 25µL para o tubo AST (tubo com meio) ao qual foi previamente adicionada uma gota de indicador redox. A leitura é feita com base na turvação do meio e da mudança do indicador devido ao metabolismo e crescimento bacteriano.

Os resultados obtidos são posteriormente validados pelos técnicos do laboratório. Os resultados são dados como sensível ou resistente. Este equipamento também deteta marcadores de resistência, como ESBL, MRSA, VRSA e β -lactamases.^{10,11}

7.2. Controlo de qualidade

O controlo de qualidade do Aution Max Ax-4030 é realizado apenas uma vez por semana, à segunda-feira. É realizado com os controlos fornecidos pela marca do equipamento.

O controlo de qualidade interno do Phoenix é feito com estirpes ATCC, garantindo assim a precisão e a exatidão dos testes. Este controlo de qualidade ainda está a ser implementado, bem como a criação de uma bacterioteca com as estirpes ATCC.

7.3. Análises microbiológicas

No sector da microbiologia são realizadas análises bacteriológicas, parasitológicas e micológicas permitindo auxiliar o diagnóstico e a terapêutica.

O setor da microbiologia é onde chega uma maior diversidade de amostras biológicas: urina, fezes, expectoração, exsudatos vaginais, retais e uretrais, nasofaríngeo e de feridas, escamas de unhas e raspados de feridas. As amostras mais frequentes são as amostras de urina.

7.3.1. Urianálise

A urianálise, como o próprio nome indica, é a análise da urina. A urina é formada continuamente no rim e resulta da ultrafiltração do plasma. É produzida em média 1200mL de urina por dia. A urina é composta por 95% de água e 5% de solutos, sendo a ureia o soluto que se encontra em maior quantidade. Esta composição pode variar com a alimentação, o metabolismo e funções endócrinas e a atividade física.^{12,13}

A urina é normalmente um fluido estéril quando secretada no rim em condições normais, ou seja, sem que haja infecção renal. É apenas colonizada por algumas bactérias quando chega à uretra, já que esta tem um microbiota própria, e por contaminação vaginal ou da genitália externa. Deste modo a urina eliminada não é um fluido estéril.^{12,13}

Vários distúrbios podem afetar o trato urinário superior (ureteres e rins) e/ou o trato urinário inferior (bexiga e uretra). A presença de infecções urinárias depende muito do sexo e da idade, sendo mais frequente em mulheres devido à sua anatomia, isto é, a uretra feminina é mais curta comparativamente à masculina e também mais próxima da região perianal, que é muito colonizada por microrganismo devido à temperatura e humidade. Assim, os microrganismos têm mais facilidade em chegar à bexiga da mulher. Os homens começam a ter maior incidência de infecções urinárias a partir dos 60 anos, momento em que o aumento da próstata interfere na eliminação da urina pela bexiga já que o aumento desta glândula pode estreitar a uretra e dificultar o fluxo urinário.^{12,13}

As infecções urinárias são também complicações da diabetes, de doenças renais, transplantes renais e deformidades estruturais e neurológicas que afetam o fluxo normal da urina.^{12,13}

O agente patogénico mais comum nas infecções adquiridas na comunidade é a espécie *Escherichia coli* uropatogénica (UPEC). Nos últimos anos, *E. coli* O25-H4 tem sido um dos patógenos com mais significado nas infecções adquiridas na comunidade. Outras bactérias estão também muito associadas a este tipo de infecções. Nas formas mais ligeiras de infeção podem estar associadas *Klebsiella spp.*, outras enterobactérias, *Staphylococcus saprophyticus* e enterococos. Nas formas mais graves encontram-se *Proteus spp*, *Pseudomonas*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter spp.*^{12,13}

Existem ainda outro tipo de microrganismos associados a estas infeções urinárias da comunidade, embora menos comuns, como *Acinetobacter spp.*, *Citrobacter spp.* e *Gardnerella vaginalis*. A levedura *Candida spp.* é dos poucos fungos associados a infeções urinárias, mas normalmente é detetada em situações de diabetes ou obstrução do trato urinário. O parasita *Trichomonas vaginalis* é responsável por infeções do trato genitourinário e pode ser detetado no sedimento urinário.^{12,13}

As infeções do trato urinário adquiridas na comunidade estão cada vez mais associadas a bactérias multirresistentes, como é o caso de *E.coli* produtoras as β -lactamases.^{12,13}

7.3.1.1. Colheita

A colheita de urina para as análises bacteriológicas é diferente da colheita para a análise sumária de urina. Ambas devem ser colhidas do jato intermédio da primeira urina da manhã. Para o exame bacteriológico tem de se ter cuidados específicos para que não haja contaminação, assim deve-se lavar as mãos antes de começar o procedimento. O meato uretral deve ser lavado 3 vezes com sabão neutro e de seguida enxaguar bem com água e secar. De seguida, a mulher deve afastar os grandes lábios e o homem o prepúcio e então recolher o jato intermédio.^{13,14}

Em doentes com cateter urinário tem de ocorrer a clampagem da algália, seguida da desinfeção do local da punção com um antisséptico. A urina é recolhida com agulha e seringa.^{11,12}

Em crianças podem usar-se sacos coletores e neste caso deve-se lavar os genitais externos da criança com água e sabão e colocar o saco bem adaptado. A urina é transportada no próprio saco.¹⁴

7.3.1.2. Exame a fresco

As amostras de urina são rececionadas no laboratório e depois da triagem são divididas em três grupos conforme o pedido: as que só têm análise sumária de urina; as que têm análise sumária e bacteriológica de urina; e as que só têm análise bacteriológica de urina.

A análise sumária é realizada no Aution Max Ax-4030 já descrito anteriormente. Se existir presença de sangue, leucócitos, aumento da densidade, turvação ou oscilações do pH faz-se a centrifugação da urina e análise do sedimento.

Quando só é pedida a análise bacteriológica começa-se pela centrifugação a 4000rpm/5min. Obtido o sedimento realiza-se o exame a fresco. Este consiste em colocar uma gota do sedimento entre lamina e lamela e observar ao microscópio com objetiva de ampliação de 10x

e 40x. Este exame a fresco permite perceber se foi realizada uma boa colheita e se estamos perante uma infeção, já que se pode identificar células epiteliais e de descamação, leucócitos, eritrócitos, cristais e microrganismos (bactérias, fungos e parasitas).

7.3.1.2.1. Cristais e cilindros

Os cristais são frequentes na urina, mas raramente têm significado clínico. Podem apresentar-se como estruturas bem formadas ou material amorfo. A sua identificação é importante para detetar distúrbios hepáticos, erros inatos de metabolismo dos aminoácidos que levam à sua precipitação ou danos renais causados pela cristalização nos túbulos renais.¹³

Os cristais formam-se através da precipitação de solutos urinários como sais inorgânicos, compostos orgânicos e compostos iatrogénicos, como medicamentos. A temperatura, a concentração de solutos e o pH afetam a solubilidade e assim a formação de cristais.¹³

O pH da urina é um precioso auxílio para identificar os precipitados, pois o comportamento difere de meio ácido para meio básico (Tabela 2). Os precipitados mais comuns numa urina ácida são os de ácido úrico enquanto que numa urina básica são mais frequentes os fosfatos. Os cristais de oxalato de cálcio são comuns quer em urinas básicas, quer em urinas ácidas.

Tabela 2 - Cristais presentes nos vários tipos de urina.

	Urina ácida	Urina básica	Comum
Cristais	Ácido úrico	Trifosfato (fosfato de amónio)	Oxalato de cálcio
	Cistina	Fosfatos amorfos	Colesterol
	Uratos amorfos	Fosfato de cálcio	Burato de amónia
	Tirosina		
	Leucina		

Os cilindros são estruturas exclusivas do rim, formadas no túbulo contornado distal e no tubo coletor e dão uma imagem microscópica do interior do nefrónio. Os cilindros mais comuns são os hialinos, compostos quase exclusivamente pela proteína de Tamm-Horsfall, apresentando-se incolores no sedimento urinário. Estes cilindros hialinos estão aumentados em glomerulonefrites agudas, pielonefrites, doença renal crónica e insuficiência cardíaca congestiva.¹³

7.3.1.2.2. Leucócitos

Os neutrófilos são os leucócitos predominantes no sedimento urinário e a sua presença está intimamente associada a processos inflamatórios.

Os leucócitos quando estão em grande quantidade e agrupados é sugestivo de infecção aguda, como cistites, uretrites e pielonefrites, e, portanto, a sua presença tem de ser reportada ao clínico.

Como as secreções dos tratos genitais podem conter leucócitos, é preciso excluir esta possível contaminação.¹³

7.3.1.2.3. Eritrócitos

A presença de eritrócitos no sedimento urinário pode indicar danos na membrana glomerular ou lesão vascular no trato geniturinário.

Quando há presença de hematúria macroscópica, ou seja, a urina está turva e com cor vermelha pode ser sinal de dano glomerular avançado, mas também pode estar associada a dano na integridade vascular do trato urinário, que pode ser causado por infecções ou inflamações agudas.

A hematúria microscópica é um parâmetro importantíssimo para o diagnóstico precoce de distúrbios glomerulares e para confirmar a presença de cálculos renais.¹³

7.3.1.2.4. Células epiteliais

As células epiteliais presentes na urina podem ter origem em qualquer local do trato urinário e/ou genital. Algumas células podem estar presentes na urina devido à eliminação normal de células envelhecidas. Um aumento acentuado pode indicar inflamação do trato urinário. Contudo, se não for acompanhado de outros indicadores pode apenas indicar uma má colheita.¹³

7.3.1.2.5. Microrganismos

Quando uma urina, bem colhida, tem uma grande quantidade de bactérias, acompanhada por leucócitos, é indicativo de infecção do trato urinário.¹⁵

A presença de bactérias é facilmente reconhecida quando o sedimento é observado aos microscópio em grande ampliação. Um observador treinado consegue até distinguir bactérias patogénicas de bactérias da flora normal.

Estruturas leveduriformes são comuns em urinas de diabéticos, em particular *Candida spp.*, mas podem aparecer por contaminação da microbiota da pele e da vagina.¹⁵

Parasitas podem aparecer ocasionalmente, podendo ter origem no trato urinário, ou uma vez mais, por contaminação fecal ou genital. Se houver suspeita de infecção parasitária é extremamente importante a observação microscópica do sedimento.¹⁵ Durante o estágio apenas uma única vez observei estruturas parasitárias, trofozoítos de *Trichomonas vaginalis*, numa amostra de urina masculina que continha sinais de infecção,

7.3.1.3. Coloração de Gram

A coloração de Gram é a principal coloração usada no exame microscópico de bactérias, pois permite uma identificação presuntiva da bactéria presente, permite aferir a qualidade da amostra e ainda distinguir a microbiota normal dos agentes patógenos.

Esta coloração permite detetar quase todo o tipo de bactérias, com exceção das intracelulares, das que não possuem parede celular e das que tem dimensões reduzidas que não se conseguem observar ao microscópico ótico.

Com a coloração de Gram as bactérias são divididas em dois grandes grupos: as Gram positivas, ou seja, as que retêm o violeta de genciana e coram de roxo; as Gram negativas que descoram com o diferenciador e coram de rosa com o corante secundário, a fucsina de Ziehl.

A coloração de Gram diferencia as bactérias consoante a estrutura química da parede celular, bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas. As bactérias gram-positivas contêm na parede celular peptidoglicano e ácidos teicóicos, enquanto que as bactérias gram-negativas possuem uma camada de peptidoglicano substancialmente mais fina e uma membrana externa que é constituída por uma camada interna de fosfolípidos e uma externa de lipopolissacárido¹⁶.

Após o todo o exame microscópico e se tivermos perante uma infecção tem de se fazer cultura dessa urina para que se possa identificar a bactéria e sugerir a terapêutica antibacteriana.

7.3.1.4. Exame cultural

O exame cultural é imprescindível para identificar os patógenos presentes. Consiste em semear, neste caso a urina, em meio de cultura para que haja o isolamento microbiano e posterior identificação o mais rápido possível.

Os meios de cultura podem ser classificados em meios de enriquecimento, nutritivos, seletivos e diferenciais.

✓ Meios de enriquecimento

Os meios de enriquecimento contêm nutrientes necessários ao crescimento bacteriano quer esteja presente uma única espécie bacteriana ou várias. Contudo, são usados para aumentar o crescimento de determinados patógenos uma vez que são fornecidos nutrientes específicos para tal.¹⁵ Tanto podem ser meios sólidos, como o BCYE, ou meios líquidos, como o caldo Todd-Hewitt.

✓ Meios seletivos

Os meios seletivos contêm um ou vários componentes que inibem a maioria dos microrganismos com a exceção daquele que cresce especificamente no meio, ou seja, promovem o crescimento de uma determinada espécie em detrimento das outras.¹³ São usados vários inibidores de crescimento como corantes, sais biliares e antibióticos. Mas não há garantia de que os organismos sejam completamente inibidos, podendo crescer em reduzida quantidade.¹⁵

O meio SS é um exemplo de meio seletivo permitindo o crescimento de *Salmonella* e *Shigella spp.*

✓ Meios nutritivos

Os meios nutritivos são ricos em nutrientes que suportam o crescimento da maioria dos microrganismos não fastidiosos. Não privilegiam o crescimento de uma espécie em detrimento de outra. Exemplos destes meios são o meio de Sabouraud, específico para fungos e o meio com tripticase de soja, que permite o crescimento de quase todo o tipo de bactérias.¹⁵

✓ Meios diferenciais

Os meios diferenciais têm constituintes, como indicadores e açúcares, que permitem o crescimento de colónias de determinada espécie exibindo características metabólicas ou de cultura que as distinguem das restantes, isto é, ao fermentarem um determinado açúcar, por exemplo, alteram o pH do meio, que devido ao indicador presente, vai alterar a cor do meio. A gelose de MacConkey, por exemplo, diferencia as bactérias fermentadoras de lactose das não fermentadoras.¹⁵ É importante que os meios tenham mais do que uma característica, isto é, que sejam, por exemplo, meios diferenciais e seletivos como o caso da gelose manitol-sal que é seletiva para os estafilococos e diferencial para o *S. aureus*, pois a cultura fica amarela quando está presente e vermelha quando ausente.¹⁵

No laboratório a urina é semeada tendo em conta as estruturas observadas no exame microscópico (Tabela 3). O meio normalmente utilizado para semear a urina é o CHROMOagar Orientation, que é um meio nutritivo pois permite o crescimento de todo o tipo de bactérias e diferencial porque é cromogéneo, ou seja, cada espécie desenvolve colónias com uma cor específica (Fig.3).



Figura 3- Observação de colónias bacterianas em meio de cultura CHROMOagar Orientation: *E. coli* – rosa escuro; *Enterococcus* – azul turquesa; *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter* – azul metálico; *Proteus* – halo castanho; *Pseudomonas* – creme, translúcidas; *S. aureus* – douradas, opacas e pequenas; *S. saprophyticus* – cor de rosa opacas e pequenas.

Tabela 3 - Seleção dos meios de cultura na análise bacteriológica de urina.

Coloração de gram	Morfologia	Meio de cultura	Incubação
Gram positivo	Cocos em cacho	CHROMOagar Orientation Manitol-Sal	18-24 horas Aerobiose 35°C
	Cocos em cadeia	CHROMOagar Orientation	
Gram negativo	Bacilos	CHROMOagar Orientation	24-48 horas 5% de CO ₂ 35°C
	Diplococos	Cled PVX (gelose de chocolate)	
Fungos leveduriformes		Sabouraud	24-48 horas Anaerobiose 35°C

7.3.1.5. Identificação e Antibiograma

A identificação da espécie presente na amostra é fundamental para o diagnóstico, porque permite distinguir patógenos de contaminantes e/ou microbiota normal, orienta o clínico para a patologia presente e permite ainda decidir a terapêutica a aplicar, pois tendo a bactéria identificada pode prosseguir-se para a realização do antibiograma e assim determinar a susceptibilidade aos antibióticos.¹⁵

A identificação pode ser realizada por métodos bioquímicos, serológicos ou por técnicas moleculares.

Os métodos bioquímicos são os mais usuais e avaliam a capacidade metabólica das bactérias face a determinados substratos. Estes métodos podem ser realizados manualmente recorrendo a meios seletivos e diferenciais e a provas metabólicas específicas ou recorrendo a sistemas comerciais, isto é, a galerias que contêm uma série de provas.¹⁵

Os métodos serológicos baseiam-se em reações antigénio-anticorpo, ou seja, pesquisa-se a presença de um determinado antigénio presente na bactéria, através de um anticorpo específico. Usam técnicas de imunofluorescência, ELISA e técnicas de aglutinação.¹⁵

As técnicas moleculares baseiam-se na pesquisa e análise de ácidos nucleicos ou ribonucleicos. Têm uma elevada especificidade, sensibilidade e rapidez face às técnicas bioquímicas.¹⁵

No laboratório como se utiliza um meio cromogéneo, que permite a diferenciação de algumas bactérias, não se usam técnicas de identificação para todas as situações, ou seja, se estiver presente numa amostra *E. coli* que tem uma cor específica no meio cromogéneo, não se realiza a sua identificação no painel, assumindo-se a identificação presuntiva dada pelo meio. Quando necessário a identificação é feita por métodos bioquímicos no equipamento automatizado Phoenix utilizando os painéis de substratos específicos. Por vezes utilizam-se técnicas manuais como a catalase para distinguir estafilococos de estreptococos e assim escolher o painel a utilizar para a identificação.

Após a identificação bacteriana faz-se o antibiograma, que fornece o perfil de suscetibilidade bacteriana aos agentes antimicrobianos. Este pode ser realizado de forma manual, como uma seleção de antibióticos e recorrendo ao meio Muller-Hinton ou com painéis comerciais que já contem a seleção de antibióticos para cada tipo de bactéria.

No Avelab, o equipamento Phoenix também realiza o antibiograma assim, tendo uma identificação presuntiva, escolhe-se o painel adequado para a realização do antibiograma.

Existem 4 painéis diferentes de antibiótico (Anexo 2):

- i. UNMIC/ID-409 para Enterobactérias;
- ii. NMIC/ID-415 para *Pseudomonas* e bacilos gram negativos não enterobactérias;
- iii. PMIC/ID-88 para *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus* e *Streptococcus agalactae*;
- iv. SMIC/ID-11 para *Streptococcus spp.*

Para microrganismos fastidiosos utiliza-se a técnica manual de difusão em disco, mas nunca a realizei durante o estágio pelo facto de, enquanto permaneci neste setor, nunca ter ocorrido uma situação em que fosse necessário realizar esta técnica.

7.3.2. Análise fezes

O trato gastrointestinal tem uma microbiota muito vasta e diversificada. O intestino é o órgão que tem a microbiota mais rica, já que o meio extremamente ácido do estômago não permite a sua colonização massiva.^{12,13,15}

A microbiota intestinal auxilia na manutenção de um ambiente saudável pois fornece vitaminas e nutrientes essenciais, influencia a resposta imunológica e protege a superfície da mucosa.¹⁵

O intestino delgado superior tem uma microbiota escassa, com alguns estreptococos, lactobacilos e leveduras, já o íleo distal contém enterobactérias e bacteroides. O intestino grosso tem uma predominância de bactérias anaeróbias. A microbiota vai se alterando com a idade, a genética, o estado nutricional e a terapêutica a que o indivíduo está sujeito.¹⁵

A maioria das infeções entéricas têm origem na ingestão de bactérias, vírus ou parasitas, sendo a transmissão fecal-oral a via com mais relevância. A contaminação de águas e alimentos que posteriormente são ingeridos constitui uma das principais vias de contágio com os patógenos entéricos. A idade, também, é um fator importante porque existem infeções que afetam mais uma facha etária do que outra.¹⁵

Os agentes mais comuns no mundo nas infeções entéricas são:

- ❖ Bactérias – *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium spp.*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Campylobacter*, *E. coli spp.*, *Yersinia enterocolitica* e *Listeria monocytogenes*;¹⁵
- ❖ Vírus – Norovírus, Rotavírus e Adenovírus;¹⁵
- ❖ Parasitas – *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba*, *Cyclospora*.¹⁵

As infeções do aparelho gastrointestinal têm uma grande incidência na população mundial e uma elevada taxa de morbidade, principalmente em crianças e idosos. As doenças diarreicas são a segunda principal causa de morte no mundo.¹⁵

Embora a grande parte das diarreias agudas sejam autolimitadas, as de origem infecciosa necessitam de diagnóstico e tratamento.

7.3.2.1. Exame bacteriológico e micológico

Para realizar o exame bacteriológico e micológico de fezes são necessárias 3 amostras. Após a receção das amostras no laboratório, o primeiro exame a ser realizado é o exame a fresco.

O exame a fresco compreende duas etapas, o exame macroscópico em que se analisa a cor, a consistência e a presença de muco ou sangue e o exame microscópico em que uma pequena porção de amostra é suspensa numa gota de soro fisiológico e é observada diretamente ao microscópico. Deve-se reportar a presença de leucócitos, eritrócitos e determinados microrganismos. Depois realiza-se uma coloração de Gram e por fim o exame cultural.^{14,15}

Os meios de cultura a serem utilizados dependem muito do laboratório, dos agentes infecciosos endêmicos e do tipo de população. No Avelab as fezes são semeadas em 4 meios diferentes:

- ✓ Caldo selenite – meio de enriquecimento;
- ✓ Meio Salmonella-Shigella (SS) – meio seletivo e diferencial;
- ✓ Meio Sabouraud – meio seletivo para fungos;
- ✓ Meio Campyloset – meio para *Campylobacter*.

A pesquisa de *S. aureus* e de *Y. enterocolítica* só é realizada se houver pedido específico do clínico e no caso de *Y. enterocolítica* é enviada para o laboratório de referência.

Após a incubação dos meios durante 18-24 horas a 35°C, verifica-se se ocorreu crescimento bacteriano e se as colônias são sugestivas de *Salmonella* (colônias incolores com produção de H₂S), *Shigella* (colônias incolores), *E. coli* O157-H7 (colônias rosa e vermelhas com precipitado em meio SS; fazer identificação serológica), *Campylobacter* (colônias pequenas e cinzentas; oxidase e catalase, positivas; gram – bacilos gram negativos espiralado) e *Candida spp.*. Se existir crescimento no caldo selenite repica-se uma alíquota para meio SS.

Após a identificação presuntiva, realiza-se o antibiograma. Se as colônias forem sugestivas de *Campylobacter* o antibiograma é realizado de forma manual, por difusão em disco em meio Muller-Hinton, se for uma das outras espécies é realizado um painel UNMIC/ID-409 do equipamento Phoenix (Anexo 2)

7.3.2.2. Parasitológico

Para realizar o exame parasitológico recorre-se a um método de concentração de parasitas que aumenta a possibilidade de os detetar se estiverem presentes na amostra. Existem várias técnicas para realizar a concentração dos parasitas. A utilizada no laboratório Avelab é a técnica de Ritchie que é uma técnica de concentração por sedimentação. No laboratório utilizam-se tubos que contêm formalina e Triton X que estabilizam os parasitas e os separam dos restantes constituintes das fezes. e um sistema de filtração com três camadas que retêm as partículas consoante o seu tamanho.^{14,15} Após centrifugação, o sedimento é analisado ao

microscópico. No Avelab, raramente se observam estruturas parasitárias nas fezes e durante todo o meu estágio nunca se detetou nenhuma nos exames parasitológicos de fezes.

7.3.2.3. Pesquisa de Rota-Adenovirus nas fezes

O rotavírus é o principal agente etiológico das gastroenterites infantis, mas o adenovírus também causa gastroenterites com elevada taxa de mortalidade e morbidade em crianças e imunodeprimidos.⁷A pesquisa é realizada por *lateral flow assay*. Os anticorpos fixos ligam-se ao vírus caso esteja presente na amostra.

7.3.2.4. Pesquisa de *H. pylori* nas fezes

H. pylori é a principal bactéria responsável pelas infecções crônicas do estômago e pelo carcinoma no estômago. ⁷O diagnóstico é realizado de várias formas, sendo que a pesquisa de Ag nas fezes é um dos mais simples e menos invasivos, mantendo na mesma uma boa precisão.¹⁵A pesquisa é realizada por *lateral flow assay*. O *kit* contém um tubo de diluição com uma espátula que deve ser inserida em três locais diferentes da amostra. Coloca-se uma gota da diluição na cassete. Se houver presença da bactéria na amostra a linha correspondente ao teste fica colorida.

7.3.3. Exsudato vaginal

Infeções do trato genital podem ser divididas em dois grupos, infecções exógenas e endógenas. As exógenas têm, normalmente, origem na atividade sexual não protegida, ou seja, as denominadas doenças sexualmente transmissíveis (DST). As endógenas têm origem na microbiota genital normal.^{12,15}

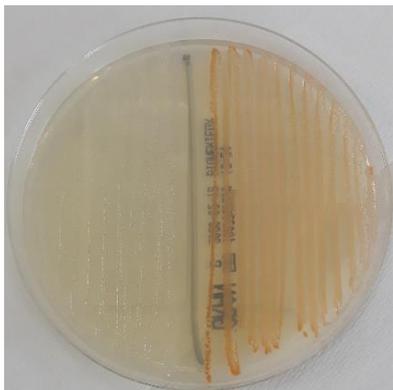
As infecções podem afetar o trato genital superior e inferior, sendo que as do trato inferior têm, por norma, origem no contato sexual ou direto. As do trato superior tendem a ser uma extensão das do trato inferior.^{12,15}

As infecções tanto afetam homens como mulheres e podem ser provocadas por todo o tipo de microrganismos, bactérias, parasitas, fungos e vírus.

As espécies mais envolvidas em infecções do trato genital são HPV, *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella/Mobiluncus*, *C. albicans*, *Herpes simplex tipo 2*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* e *Ureaplasma urealyticum*.¹⁵

7.3.3.1. Pesquisa de *Streptococcus agalactiae* em grávidas

Streptococcus agalactiae faz parte da microbiota intestinal e urogenital e é a espécie clinicamente mais importante do grupo B de Lancefield.¹⁶



S. agalactiae é um diplococo gram positivo encapsulado, que coloniza os tratos gastrointestinal e genital das mulheres grávidas, aumentando o risco de infecções invasivas nos recém-nascidos com uma elevada morbidade e mortalidade.

Nos anos 90 estabeleceu-se que a administração de penicilina ou ampicilina endovenosa no periparto a mulheres colonizadas

Figura 4- Colónias de *S. agalactiae* em meio Granada. com *S. agalactiae* diminui substancialmente o desenvolvimento de doenças no recém-nascido. Assim, em 2004 a Sociedade Portuguesa de Pediatria elaborou um protocolo de rastreio e prevenção da doença perinatal que se mantém até aos dias de hoje, e em que todas as grávidas entre as 35-37 semanas de gestação fazendo a pesquisa de *S. agalactiae*.^{16,17}

Para realizar a pesquisa colhe-se o exsudato vaginorretal com zaragatoa e inocula-se em caldo Todd-Hewitt. Se houver crescimento bacteriano, repicar para meio Granada. O resultado é dado como positivo ou negativo através da observação ou não do desenvolvimento de colónias cor de laranja no meio (Fig.4)

7.3.3.2. Análise bacteriológica, parasitológica e micológica do exsudato vaginal

A generalidade, cada mulher irá ter pelo menos uma infeção do trato genital durante a sua vida. As infeções são caracterizadas por corrimento, prurido e odor.^{15,18}

As infeções mais frequentes são a vaginose bacteriana, a candidíase e a tricomoníase. Para se distinguir o tipo de infeção tem de ser realizada uma análise laboratorial.^{15,18}

É feita uma colheita de uma zaragatoa do exsudato vaginal e após receção no laboratório realiza-se o exame microscópico.^{14,15}

O exame microscópico é dividido em duas partes, o exame a fresco e o exame após coloração.

No exame a fresco pesquisa-se células epiteliais, leucócitos, eritrócitos e microrganismos. Na coloração de Gram distingue-se o tipo de microrganismos e as “clue cells” (Fig. 5) que são células epiteliais de descamação com bastonetes e cocobacilos de gram variável.^{12,14,15}



Figura 5 – Observação microscópica de "clue cells" numa coloração de Gram.

Dependendo do tipo de microrganismos presentes prossegue-se ou não com o exame cultural.

No laboratório Avelab procede-se da seguinte forma:

- Não se faz cultura se no Gram se observar:
 - Bacilos de Dörderlein
 - Bacilos pleomórficos
 - Cocobacilos de gram variável sugestivos de *Gardnerella vaginalis*
 - Bacilos de gram negativo curtos e curvos sugestivos de *Mobiluncus spp.*
- Faz-se cultura se estiverem presentes:
 - Bacilos gram negativo
 - Cocos de gram positivos em cadeia
 - Cocos de gram positivo em cacho
 - Fungos leveduriformes ou pseudohifas
 - Diplococos de gram negativo intra e extracelulares

Consoante o tipo de microrganismo escolhe-se o meio de cultura. Em gelose Columbia com 5% de sangue de carneiro semeia-se os bacilos de gram negativo em aerobiose e os cocos de gram positivo em atmosfera com 5% de CO₂. Para os fungos leveduriformes e/ou pseudohifas usa-se o meio de Sabouraud e CandiSelect. Por fim, para os diplococos utiliza-se PVX em atmosfera com 5% de CO₂.

Após a incubação, verifica-se o desenvolvimento bacteriano e faz-se a identificação da bactéria e o teste de suscetibilidade aos antibióticos.

7.3.4. Infecções do trato respiratório

As infecções do trato respiratório superior são denominadas de acordo com os locais anatómicos envolvidos na infeção. A maioria das infeções é autolimitada e de origem viral.^{14,15}

7.3.4.1. Análise bacteriológica do exsudato da orofaringe

As faringites e as amigdalites são as infeções mais comuns do trato respiratório superior. A maioria são autolimitadas e de origem viral, mas também podem ser de origem bacteriana principalmente *Streptococcus* do grupo A.¹⁶

Assim, para se realizar a análise deve-se colher uma zaragatoa orofaríngea, inocular a zaragatoa em meio Columbia com 5% sangue de carneiro e incubar a placa em atmosfera com 5-10% de CO₂. Ao fim de 18-24 horas verifica-se se houve crescimento bacteriano sugestivo de *Streptococcus* do grupo A, ou seja, verificar se existe β-hemólise. Faz-se a identificação presuntiva recorrendo-se à prova da catálase, neste caso é positiva, e ao teste da bacitracina, em que se repica duas ou três colónias para o mesmo meio mas agora com um disco de bacitracina e se no fim da incubação não houver crescimento é sinal que a bactéria é sensível, logo é indicativo *Streptococcus* do grupo A.

Depois desta identificação presuntiva, realiza-se a identificação e o TSA no equipamento automático.

Deve-se ainda valorizar o crescimento de colónias sugestivas de *Candida* spp. quando existe suspeita de candidíase oral e de *S. aureus*, *S. pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* em PVX quando há suspeita de epiglotite.

7.3.4.2. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* Meticilina-resistente (MRSA) no exsudato nasal

As penicilinas e os seus derivados são os antibióticos mais comuns para o tratamento de infeções estafilocócicas, mas as resistências são muito comuns.¹⁶

A resistência à meticilina e consequentemente a todos os β-lactâmicos é um problema preocupante pois torna muito complicado o tratamento de doenças provocadas especialmente por *S. aureus*.¹⁶

S. aureus coloniza a predominantemente as narinas, mas é uma das espécies mais associadas a infeções nos humanos, logo é importante perceber se há resistência intrínseca. ¹⁶Para tal, faz-se a pesquisa recorrendo a uma zaragatoa nasal que é inoculada CHROMID MRSA, meio cromogéneo, diferencial e seletivo.

Depois da incubação verifica-se se há crescimento bacteriano e se a as colónias adquiriam uma cor de malva, se isso acontecer dá-se o resultado como positivo, caso contrário se crescerem colónias brancas o resultado é dado com negativo.

7.3.4.3. Análise de expetoração

A expetoração é um dos produtos rececionados com frequência no laboratório Avelab. Com este produto apenas realizei a coloração de Zielh-Neelsen pelo método de Kinyoun para a pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis*, conhecido por bacilo de Koch (BK). Esta coloração é realizada para microrganismos ácido-álcool resistentes e a coloração pelo método de Kinyoun

consiste numa coloração a frio, contrariamente ao método clássico que necessita de aquecimento. Primeiro usa-se o reagente de Kinyoun, que é uma solução de carbolfucsina, e de seguida uma solução de ácido-álcool e por fim o azul de metileno.¹⁵ Os microrganismos ácido-álcool resistentes coram de vermelho enquanto que os restantes elementos celulares ficam corados de azul.

7.3.4.4. Pesquisa de Ag Streptococos do grupo A de Lancefield

O *S. pyogenes* é a bactéria mais relevante clinicamente do grupo A de Lancefield. Coloniza a orofaringe e/ou a pele, mas também causa uma grande variedade de infeções.¹⁶

Uma das infeções causadas é a faringite e os testes rápidos de deteção de antigénios são a forma mais rápida de detetar se a infeção é provocada por *S.pyogenes* ou não.¹⁶ Para realizar a pesquisa usa-se o *lateral flow assay* e procura-se o antigénio à custa dos anticorpos presentes na cassette. Se for positivo aparece uma linha colorida na linha teste.

7.3.5. Confirmação fenotípica de ESBL

A confirmação fenotípica das β -lactamases de espectro alargado (ESBL) é realizada quando o equipamento Phoenix indica a sua presença. As enterobactérias produtoras de β -lactamases hidrolisam penicilinas e cefalosporinas, mesmo as de espectro alargado. Assim, para confirmar o resultado dado pelo equipamento realiza-se um método manual.¹⁶

Prepara-se um inóculo de 0,5 McFarland e inocula-se em meio Muller-Hinton. De seguida dispensam-se discos de ceftazidime, cefotaxime, cefepime e amoxicilina com ácido clavulânico no centro, pois o ácido clavulânico é um inibidor de ESBLs.¹⁶

Incuba-se a placa e após 18-24 horas verifica-se se há crescimento bacteriano. Se existir um halo à volta do disco de antibiótico é sinal que a bactéria é sensível, ou seja, não há crescimento logo não há produção de ESBL. Se não existir o halo de inibição é porque a bactéria é produtora de ESBL e é resistente ao antibiótico.

7.3.6. Pesquisa de enterobactérias produtoras de carbapenemases

Os carbapenémicos são a classe de antibióticos que são utilizados em infeções causadas por bactérias produtoras de AmpC β -lactamases. No entanto muitas bactérias desenvolveram mecanismos de resistência a esta classe de antibióticos através da produção das carbapenemases.¹⁶ Para fazer a pesquisa é necessária uma zaragatoa anal que é inoculada em CHROMagar mSuperCARBA. Como é um meio cromogéneo, dependendo da cor que a colónia adquirir pode-se dar o resultado como positivo ou negativo (Tabela 4).

Tabela 4- Microrganismos produtores de carbapenemases

Microrganismos	Aspetto da colônia	Resultado
E. coli	Rosa e vermelho	Positivo
Coliformes	Azul metálico	
Pseudomonaceae	Translucidas/ creme a verde	
Acinetobacter spp.	Creme	
Coliformes/E. coli não produtores	Incolores	Negativo
Outros bacilos de gram negativo não produtores	Não há crescimento	
Gram positivo	Não há crescimento	

7.3.7. Serologia infecciosa

7.3.7.1. TPHA e VDRL

Treponema pallidum é o agente etiológico da sífilis, doença sexualmente transmissível com uma distribuição mundial. É usualmente adquirida por contato direto com lesões húmidas, cutâneas ou mucosas de indivíduos infetados.^{6,13}

Existem vários métodos de diagnóstico para esta doença, mas os métodos serológicos são os mais usados. Estes são divididos em dois grupos, os testes treponémicos que são testes específicos e os não-treponémicos que são inespecíficos.



Figura 6 - Teste VDRL positivo

Os testes não-treponémicos evidenciam anticorpos anticardiolipina das classes das imunoglobulinas IgM e IgG produzidos na sequência da infeção. Um exemplo destes testes é o *Veneral Disease Research Laboratory* (VDRL), que é um teste quantitativo, de aglutinação e é realizado no soro. Se existirem anticorpos há aglutinação dos antígenos e isto é visível ao microscópico, ou seja, a amostra de soro é inoculada com antígenos e se existir aglutinação dá-se como positivo o teste (Fig. 6).¹⁶

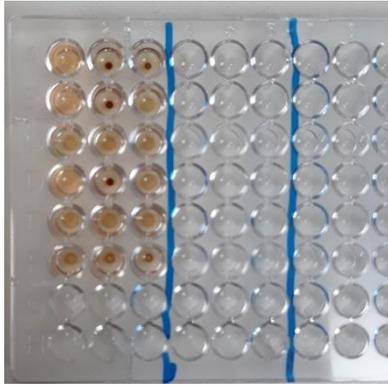


Figura 7 - TPHA positivo e negativo

Os testes treponémicos pesquisam anticorpos específicos de *T. pallidum*. Um desses testes é o *Treponema pallidum Hemagglutination Assay* (TPHA) é que é um teste de hemaglutinação indireta que usa eritrócitos sensibilizados que se agregam quando expostos ao soro do paciente positivo (Fig. 7) ¹⁶

7.3.7.2. IgM e IgG anti- *H. pylori*

Como já foi referido, *H. pylori* é a principal bactéria envolvida em infeções do estômago e pode ser detetada de variadíssimas formas e uma delas é a pesquisa de anticorpos no soro. O teste mais comum é o imunoenzimático ELISA, mas o teste rápido também é muito utilizado devido à sua praticabilidade e rapidez.

A pesquisa das imunoglobulinas, IgM e IgG é realizada por *lateral flow assay*, sendo que no laboratório Avelab apenas se realiza a pesquisa de IgG e a pesquisa de IgM é enviada para um laboratório externo. Quando existe um pedido de pesquisa das duas imunoglobulinas, o laboratório tem protocolado que se a pesquisa de IgG for positiva o resultado é dado como positivo para ambas as imunoglobulinas e se for negativo ou se só existir for pedido IgM, a amostra é enviada para um laboratório externo¹⁶.

7.3.7.3. COVID-19

A COVID-19 é a doença provocada pela SARS-CoV-2, vírus que pertence à família *Coronaviridae*.

Os coronavírus provocam infeções ligeiras no trato respiratório inferior, sendo o segundo agente mais comum das constipações. Em novembro 2002 emerge o SARS-CoV-1, vírus da família dos coronavírus, que provoca a síndrome respiratória aguda severa e veio demonstrar o potencial destes vírus. Surgiu um surto no sul da China, que se espalha pelo mundo atingindo 28 países, ocorrendo 8098 casos e 774 mortos. Em junho de 2003 deu-se o vírus com controlado.

Em dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, na China é identificado o SARS-CoV-2, que nunca tinha sido detetado em humanos. Rapidamente se espalha por todo o mundo e a OMS declara o estado de pandemia a 11 de março de 2020. Milhões de pessoas têm sido infetadas e milhares

de mortes batem recordes todos os dias, não estando ainda a infeção controlada, muito pelo contrário, já que o mundo se encontra a atravessar uma segunda vaga da pandemia.

O SARS-CoV-2 é um vírus que afeta principalmente o trato respiratório inferior. O controlo da infeção é complicado já que o vírus pode não causar sintomas e as pessoas não se aperceberem que estão infetadas. Por outro lado, pode manifestar-se de forma tão grave, como é o caso de pneumonia, que leva a que os doentes tenham de ser internados nos cuidados intensivos, sendo a morte a consequência mais grave, principalmente em pessoas pertencentes a grupos de risco.^{6,7}

7.3.7.3.1. Testes COVID-19 no laboratório Avelab

O Avelab é um dos laboratórios de referência da DGS. Numa primeira fase eram feitas apenas as colheitas e os testes serológicos, ou seja, as zaragoas eram enviadas para laboratórios exteriores.

Os testes serológicos foram realizados por *lateral flow assay*, método baseado na interação específica Ag-Ac (Fig. 8). A amostra de soro é colocada na membrana, reage com o Ag do SARS-CoV-2 conjugado com partículas coloridas, migra ao longo da membrana por capilaridade e reage com as IgM e IgG anti-humanos fixas e aparece uma linha colorida indicativo de que existem as imunoglobulinas anti- SARS-CoV-2 na amostra. É importante que a linha de controlo esteja sempre presente para validar o método (Fig. 8).⁸

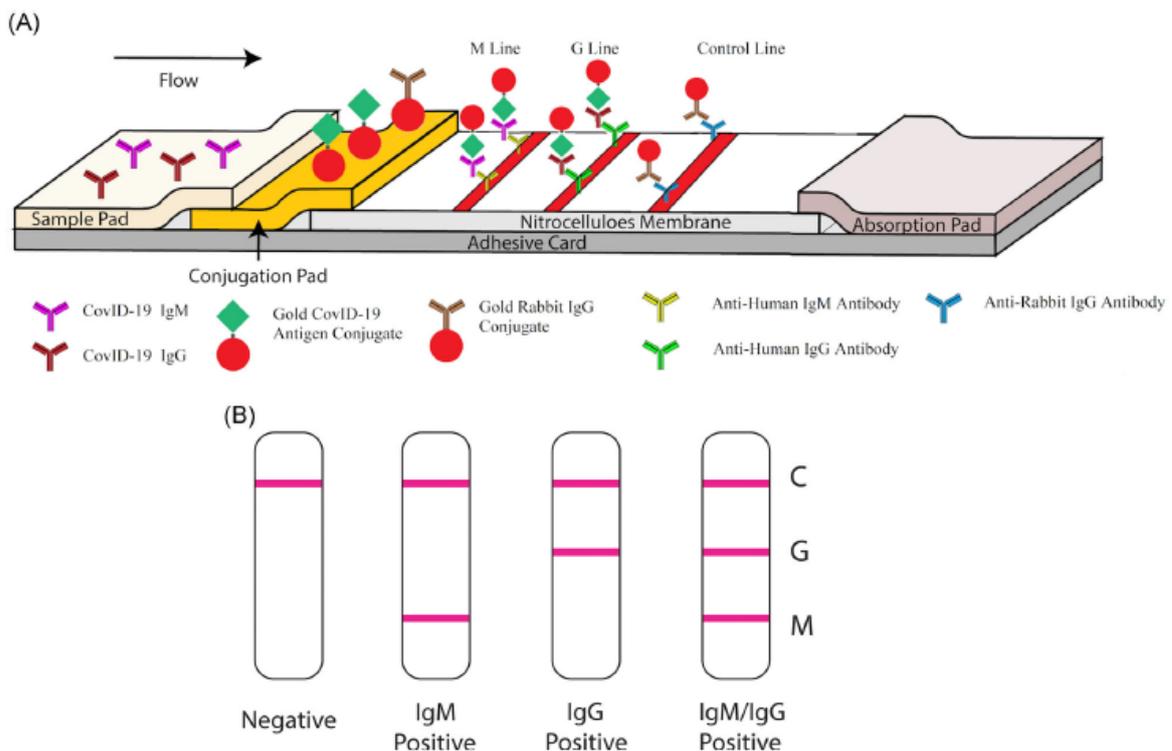


Figura 8 - Esquema ilustrativo do teste serológico da SARS-CoV-2-IgM-IgG⁸

No meu estágio tive o privilégio de observar a realização destes testes, mas não de os realizar pois como havia perigo de contágio apenas eram realizados por técnicos do laboratório. De salientar que os resultados considerados fracos positivos para a IgG são confirmados no i1000.

Aquando do término do estágio estava a começar a ser implementada a biologia molecular com a realização dos testes de diagnóstico por RT-PCR evitando assim o envio das amostras para laboratórios exteriores.

7.3.8. Espermograma

Quando há dificuldade em um casal engravidar podem existir problemas de fertilidade de ambas as partes e a análise do esperma é uma forma de testar a fertilidade do homem. Aproximadamente 40% dos casos de infertilidade é devido a distúrbios no sistema reprodutor masculino e o espermograma pode descartar esses distúrbios.¹⁹

Se o espermograma revelar algum tipo de distúrbio devem ser realizados testes de diagnóstico adicionais para revelar a causa.¹⁹

Para realizar o espermograma a colheita deve ser realizada no máximo 30 minutos antes. São analisados vários parâmetros macroscópicos e microscópicos:¹⁹

- Aspeto – o normal é ser branco-acinzentado, translúcido e com cheiro característico de mofo.
- Liquefação – a liquefação da amostra deve estar concluída no máximo em 60 minutos se no fim desse tempo ainda existirem corpos gelatinosos dá-se a liquefação como incompleta e se não existirem é completa.
- Volume – o volume normal é de 2 a 5 mL. Deve ser medido com uma pipeta graduada. A diminuição do volume está associada a infertilidade.
- Viscosidade – a viscosidade refere-se à consistência do fluido. Com uma pipeta deixa-se cair, por gravidade, gotículas, se estas tiverem mais de 2 cm a amostra é dada como altamente viscosa.
- pH – o esperma tem um valor normal de 7,2 a 8,0. Aumento de pH é indicativo de infeção do trato reprodutivo.
- Concentração e contagem de espermatozoides – o número de espermatozoides é uma medida válida para avaliar a fertilidade. Os valores de referência são de 20-250 milhões de espermatozoides por mililitro. A contagem é calculada pela multiplicação da concentração pelo volume da amostra.

- Motilidade – o movimento progressivo é um aspeto crítico para a fertilidade dado que os espermatozoides têm de ter capacidade para conseguir mover-se pela Trompa de Falópio até encontrarem o óvulo.
- Morfologia – a presença de espermatozoides morfológicamente incapazes de fertilizar é uma causa de infertilidade. É avaliado a cabeça, pescoço, peça intermédia e cauda.

Os parâmetros microscópicos são analisados entre lâmina e lamela: a aglutinação que é adesão dos espermatozoides moveis (cabeça-cabeça, cauda-cauda ou de forma mista); a aderência dos espermatozoides imoveis uns aos outros ou dos moveis a filamentos de muco, células não espermáticas ou a detritos; morfologia; e a mobilidade.¹⁹

A contagem dos espermatozoides é realizada em camara de Neubauer com o esperma diluído numa proporção de 1:20. Esta diluição é essencial para a imobilização do esperma ¹⁹. Os espermatozoides são contados nos quatro cantos e no quadrados centrais do quadrado grande central. Coloca-se a amostra na camara e deixa-se repousar 3 a 5 minutos antes de começar a contagem. A contagem deve ser dupla e a média é usada nos cálculos. Só se devem contar os espermatozoides totalmente desenvolvidos.¹⁹

Os leucócitos e os espermatozoides imaturos podem ser importantes se a sua contagem for superior a 1 milhão por mililitro. Se tivermos mais de 1 milhão de leucócitos é sinal de inflamação e infeção dos órgãos reprodutores que pode levar à infertilidade e se tivermos mais de 1 milhão de espermatozoides imaturos por mililitro pode indicar a interrupção da espermatogénese devido a infeções virais, exposição a produtos químicos tóxicos e distúrbios genéticos.¹⁹

8. Hematologia

A hematologia é o ramo da ciência que estuda o sangue, as suas doenças e os seus distúrbios.

O sangue é composto por uma matriz líquida, o plasma, e elementos celulares. O plasma constitui 55% do volume total e os elementos celulares 45%. O volume total de sangue é de 4 a 5 litros nas mulheres e 5 a 6 litros nos homens.^{20,21}

O plasma é a parte líquida do sangue constituído por 91% de água e 9% de outras substâncias como proteínas, iões, nutrientes, gases, produtos de excreção e substâncias reguladoras. Nos elementos celulares encontramos eritrócitos, leucócitos e plaquetas.²¹

O sangue tem como funções principais o transporte de moléculas, a regulação do pH e osmose, a manutenção da temperatura corporal e protege contra substâncias estranhas.²¹

A produção das células sanguíneas, a hematopoiese, não decorre sempre no mesmo local, vai alterando ao longo do tempo. A medula óssea é o local mais importante.²⁰

A hematopoiese pode ser dividida eritropoiese, mielopoiese, linfopoiese, formação de monócitos e macrófagos e megacariopoiese, isto é, formação de eritrócitos, de leucócitos e de plaquetas e todas elas derivam de células pluripotentes da medula óssea.²⁰

A formação de eritrócitos inclui sete etapas, passando por proeritroblasto, três fases de eritroblasto, reticulócitos e por fim eritrócitos. A formação dos leucócitos é dividida em várias linhagens embora derivem todas da mesma célula mãe.²⁰

Os distúrbios e as doenças sanguíneas podem afetar qualquer uma das células progenitoras ou células finais, sendo o hemograma a análise mais comum para se avaliar essas situações. No hemograma podem ser detetadas várias patologias hematológicas, sendo a mais frequente é a anemia.²⁰

8.1. Hemograma

O hemograma é a análise ao sangue que fornece informações acerca dos seus constituintes através da contagem total dos eritrócitos, quantificação da hemoglobina, determinação do hematócrito e contagem e diferenciação dos leucócitos.^{22,23}

Embora as informações dadas pelo hemograma não sejam completamente específicas é uma ferramenta importante para avaliar algumas situações, como diagnosticar doenças hematológicas e a sua evolução, detetar quadros infecciosos e monitorizar terapêuticas.²²

No laboratório Avelab o hemograma é realizado nos equipamentos automáticos Sysmex-XE2100 e Sysmex-XT2000i avaliando-se:

- **Contagem de células** – os eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas são contados por impedância ou por dispersão da luz.
- **HGB (hemoglobina)** – o eritrócito é constituído por uma membrana e pela hemoglobina. A principal função da hemoglobina é realizar a troca de gases, isto é, transportar o oxigénio até aos tecidos e fazer o retorno do dióxido de carbono. A hemoglobina é a predominante nos adultos. A sua deteção é realizada por espectrofotometria a 540 nm, sendo o método da cianometahemoglobina o mais utilizado.
- **HTC (hematócrito)** – volume de massa eritróide de uma amostra de sangue, correlacionando-se com a viscosidade sanguínea.
- **MCV (volume corpuscular médio)** – determina-se o volume médio de cada eritrócito.
- **MHC (hemoglobina corpuscular média)** – conteúdo médio de hemoglobina existente em cada eritrócito.
- **MCHC (concentração média de hemoglobina globular)** – índice calculado a partir do valor da hemoglobina e do hematócrito que significa quanto de hemoglobina média percentualmente está contida em cada eritrócito.
- **RDW (distribuição do volume eritrocitário)** – expressão numérica da anisocitose.

8.1.1. Sysmex-XE2100 e Sysmex-XT2000i

O Sysmex-XE 2100 e o XT-2000i são dois autoanalisadores hematológicos que combinam a impedância e métodos óticos para gerar o hemograma completo, uma contagem diferencial de leucócitos e contagem de reticulócitos.²⁴

Os equipamentos estão equipados com um laser semiconductor de 633 nm e três detetores óticos, um de dispersão direta da luz que vai indicar o tamanho das células, um de dispersão lateral da luz que indica a estrutura celular interna e um de fluorescência.²⁴

A diferenciação dos leucócitos é realizada com um corante, que cora o DNA, RNA e as estruturas citoplasmáticas. Num primeiro canal a contagem diferencial é realizada por fluorescência e por dispersão lateral. Num segundo canal a amostra de sangue é diluída, os eritrócitos sofrem lise e os leucócitos retraem-se, à exceção dos basófilos, conseguindo-se, assim, diferenciar os leucócitos em neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, basófilos e monócitos.²⁴

A impedância é utilizada para a contagem de eritrócitos e plaquetas. A concentração de hemoglobina é medida fotometricamente. Ocorre uma reação com o laurilsulfato de sódio

(SLS) que hemolisa os eritrócitos, existe alteração da globina e oxidação do grupo heme da hemoglobina. O grupo hidrofílico do SLS liga-se ao grupo heme e forma-se um complexo corado que é analisado fotometricamente.²⁴

Os reticulócitos são contados usando um corante que cora o RNA e há contagem por dispersão frontal e fluorescência.²⁴

8.2. Velocidade de sedimentação

A velocidade de sedimentação é um dos parâmetros analisados no laboratório de hematologia que permite indicar e monitorizar o aumento da atividade inflamatória causada por várias situações, doenças autoimunes, infecções ou carcinomas. Não é específico para nenhuma doença, mas conjugado com outros testes pode ajudar na detecção e controlo da atividade inflamatória.²⁵

O método de referência é o de Westergren. É utilizado um tubo de vidro ou plástico, vertical e alongado e mede-se a distância, em milímetros, dos eritrócitos que ficam no fundo do tubo por ação da gravidade.²⁵

Neste momento, utilizam-se equipamentos automáticos para realizar esta análise, mas baseia-se no mesmo método.

8.2.1. STARRSED Compact

O STARRSED Compact é um equipamento automático que analisa a taxa de sedimentação dos eritrócitos de acordo com o método Westergren, usando tubos de sangue com EDTA.²⁶

A leitura das pipetas de sedimentação é realizada com um sensor ótico que se movimenta ao longo da pipeta.²⁶

Um equipamento automático tem diversas vantagens uma vez que mantém sempre as pipetas cheias até ao nível correto, utiliza tubos fechados diminuindo muito a possibilidade de contaminação da amostra, reduz os erros de identificação devido ao leitor de código de barras e as pipetas são lavadas e secas automaticamente.²⁶

8.3. Hemoglobina glicada A1c (HAlc)

A hemoglobina glicada A1c é determinada em pacientes com diabetes *mellitus* e permite avaliar o índice glicémico. Pode ser considerada como meio de diagnóstico da diabetes quando o seu valor é superior a 6,5%, embora se deva privilegiar sempre o valor tradicional de glicose no soro e/ou os valores da prova de tolerância à glicose oral.²⁷

A HAlc é resultado de uma reação de glicação, ou seja, uma reação não enzimática, lenta e irreversível entre a glicose que circula na corrente sanguínea e os grupos amina livres existentes na hemoglobina.²⁷

A sua determinação é realizada num equipamento automático ADAMS Alc HA-8180V e ADAMS Alc HA-8180T.

8.3.1. ADAMS Alc HA-8180V e ADAMS Alc HA-8180T

Os equipamentos ADAMS Alc HA-8180V e ADAMS Alc HA-8180T são autoanalisadores de HPLC que quantificam HbF, HbA2 e HbAlc e sinalizam picos anormais.^{28,29}

O princípio de medição é baseado na cromatografia de troca catiónica de fase reversa usando um sistema de eluição. O sistema utiliza tubos de sangue total e 4 microlitros são automaticamente hemolisadas e injetadas na coluna. A hemoglobina elui em tampões de fosfato inorgânico de baixa e alta qualidade. Após a eluição as amostras passam por um detetor espectrofotométrico que faz a leitura a 420 e 500 nm.^{28,29}

8.4. Estudo morfológico do sangue periférico

O estudo morfológico do sangue periférico é realizado quando ocorrem alertas do equipamento ou ao analisar os resultados se constata que há uma diminuição do número de plaquetas, MHC e MCV aumentados ou diminuídos, hemoglobina baixa ou quando o equipamento deteta blastos que têm de ser confirmados. É analisado a morfologia das células, a presença de percursores e a quantidade de células.

Para realizar este estudo, no laboratório Avelab utiliza-se a coloração de May-Grünwald-Giemsa.

8.4.1. Coloração de May-Grünwald-Giemsa

A coloração May-Grünwald-Giemsa é o método de referência para as colorações hematológicas.³⁰ É uma coloração policromática em que os elementos acidófilos coram de cor de rosa, como os eritrócitos, e os elementos basófilos coram ligeiramente de azul, como o citoplasma dos leucócitos que fica quase transparente com os grânulos bem delimitados.³⁰

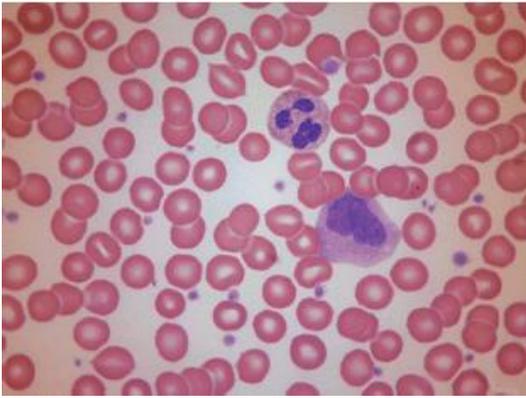


Figura 9 - Figura 9 – Coloração de May-Grünwald-Giemsa de um esfregaço sanguíneo

A Figura 9 representa uma coloração de May-Grünwald-Giemsa de um esfregaço sanguíneo em que se observam eritrócitos, plaquetas, um neutrófilo e um monócito.

8.5. Casos Clínicos

Durante o estágio, tive contato com alguns casos clínicos que sugeriam patologias hematológicas importantes.

8.5.1. Anemia

Segundo a OMS a anemia é definida como a diminuição do número de eritrócitos ou da concentração de hemoglobina normal. A hemoglobina é necessária ao transporte de oxigênio, se esta estiver diminuída os tecidos deixam de ser oxigenados devidamente o que vai provocar sintomas como fadiga, tonturas e falta de ar.³¹ A anemia é um grave problema de saúde publica global e afeta principalmente crianças e mulheres grávidas.

As anemias são classificadas segundo os parâmetros hematológicos em anemias microcíticas, macrocíticas e normocíticas, consoante os valores de MCV estão diminuídos, aumentados ou normais respetivamente.

Dentro das anemias microcíticas estão as anemias por deficiência de ferro, as talassémias, algumas anemias das doenças crónicas, intoxicação por chumbo e algumas anemias sideroblásticas.

As anemias macrocíticas podem ser classificadas em megaloblásticas quando existe deficiência de Vit. B₁₂ e folatos e não megaloblásticas quando têm origem no abuso de álcool, em hepatopatias, mielodisplasias e anemias aplástica.

Nas anemias normocíticas encontramos a anemia hemolítica, casos de anemia de doenças crónicas, anemia pós-hemorrágica aguda, nefropatias, deficiências mistas e insuficiências da medula óssea.

As anemias tem variadas causas, todavia, as mais comuns são as deficiências nutricionais, essencialmente a deficiência de ferro, mas também as de folato e vitamina B12 e vitamina A.³¹

Caso Clínico:

O caso clínico com que tive contato era de uma senhora de 50 anos com um hemograma (Tabela 5) e um esfregaço sanguíneo (Fig. 10) sugestivo de anemia por deficiência de ferro.

O hemograma mostrou uma concentração de hemoglobina muito diminuída em relação aos valores de referência (Anexo 3), MCV e MCH diminuídos. Todos os outros parâmetros encontram-se dentro dos valores de referência.

Tabela 5 - Hemograma

Parâmetro	Resultado
WBC	8,86 × 10 ³ µL
RBC	2,49 × 10 ⁶ µL
HGB	4,4 g/dL
HCT	17,0 %
MCV	68,3 fL
MCH	17,7 pg
MCHC	25,9 g/dL
PLT	490 × 10 ³ µl
RDW	19,6%
NEUT	59,6%
LYMPH	32,2%
MONO	5,4%
EO	1,8%
BASO	1,0%
IG	0,1%

Atendendo ao perfil hematológico realizou-se um esfregaço sanguíneo para confirmar a suspeita de uma anemia microcítica e hipocrômica prenunciada.

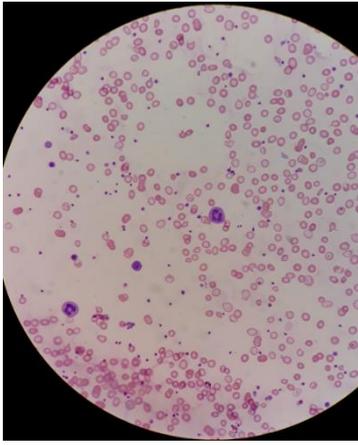


Figura 10 - Esfregaço sanguíneo corado por May-Grünwald-Giemsa: observação de neutrófilos em bastão e eritrócitos hipocrômicos

O esfregaço sanguíneo apresentou eritrócitos em charuto e em alvo, com hipocromia acentuada, plaquetas gigantes, um neutrófilo em bastão e anisopoiquilocitose moderada.

Apenas com estes dados laboratoriais não se pode concluir sobre a origem da anemia, mas suspeita-se de uma anemia por deficiência de ferro por ser a causa mais comum. Para ser devidamente caracterizada teria de se recorrer à determinação de outros parâmetros como o ferro e a ferritina sérica, que neste caso particular não foi avaliado no laboratório.

8.5.2. Leucemia mieloide crónica

A leucemia mieloide crónica é uma doença clonal de uma célula tronco pluripotente. Em cerca de 50% dos casos o diagnóstico ocorre acidentalmente quando se realiza um hemograma de rotina.

Apresenta sintomas comuns aos da anemia, como palidez, dispneia e taquicardia, mas também inclui perda de peso, suores noturnos, esplenomegalia e insuficiência renal.

Laboratorialmente é caracterizada por uma leucocitose acentuada, anemia normocítica e normocromica e um espectro completo de células mieloides no esfregaço sanguíneo.²⁰

Caso Clínico:

Uma senhora de 75 anos apresentou uma leucocitose acentuada, uma indicação pelo equipamento de blastos e uma LDH elevada (Tabela 6). Com estes resultados realizou-se a observação do esfregaço sanguíneo pois o número de leucócitos estava muito aumentado e as frações das células também estavam alteradas, tendo um elevado número de basófilos.

Tabela 6 - Hemograma

Parâmetro	Resultado
WBC	180,52 × 10⁹ L
RBC	3,91 × 10 ⁶ µL
HGB	11,3 g/dL
HCT	36,6%
MCV	93,6 fL
MCH	28,8 pg
MCHC	30,9 g/dL
PLT	276 × 10 ³ µl
RDW	18,7%
NEUT	83,7%
LYMPH	6,6%
MONO	5,1%
EO	0,9%
BASO	3,7%
LDH	814

No esfregaço observou-se células imaturas, mielócitos, metamielócitos e promielócitos (Fig. II).

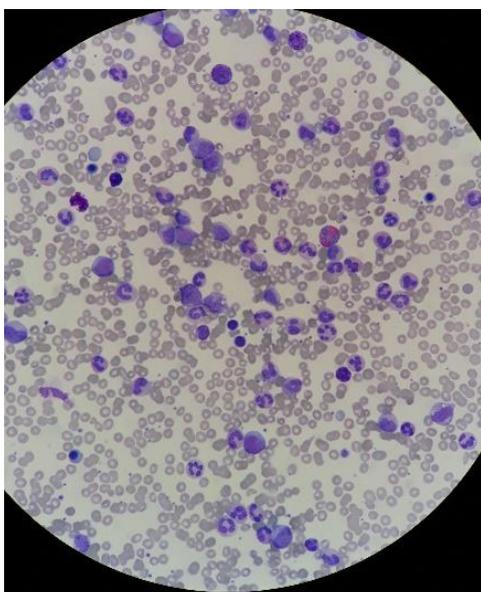


Figura II - Esfregaço sanguíneo corado por May-Grünwald-Giemsa. Observam-se linfócitos, basófilos, eosinófilos e promielócitos.

Este utente já tem histórico no laboratório e segundo a evolução dos dados pode-se suspeitar de uma leucemia mieloide crónica, não o podendo afirmar com toda a segurança pois faltam dados de outros meios de diagnóstico.

8.6. Hemostase e coagulação

A resposta ao dano vascular depende intimamente da interação entre a parede vascular, as plaquetas e os fatores de coagulação. É essencial para a sobrevivência que este mecanismo seja rápido e eficiente a estancar a hemorragia em locais de lesão vascular, mas também tem de ser extremamente controlado para evitar que se formem coágulos extensos e para que estes sejam desfeitos. Assim, tem de existir um equilíbrio entre pró-coagulantes, anticoagulantes e o processo de fibrinólise.²⁰

As plaquetas têm como principal função a formação de um tampão mecânico aquando de lesões vasculares. Quando há uma ausência de plaquetas ocorre hemorragia de pequenos vasos. As funções das plaquetas podem dividir-se em quatro reações: adesão, agregação, libertação e amplificação.²⁰

O processo da coagulação envolve uma cascata de reações. A lesão vascular dá início ao processo da coagulação e algumas substâncias como o fator tecidual e o fator VII, ativam, por proteólise, uma cascata de proteínas precursoras, os fatores enzimáticos da coagulação. Estes fatores por sua vez convertem o fibrinogénio em fibrina. Esta infiltra os agregados plaquetares e converte os coágulos primários instáveis em coágulos hemostáticos firmes, definitivos e estáveis.²⁰

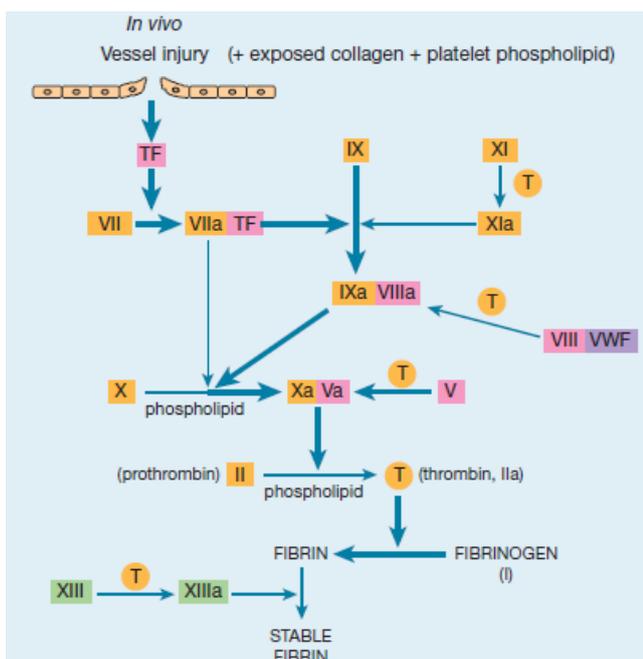


Figura 12 - Cascata da coagulação.²⁰

A cascata da coagulação (Fig. 1) pode ser dividida em duas vias, a extrínseca que inclui a iniciação da cascata e a intrínseca que envolve o processo de amplificação.²⁰

A coagulação inicia-se pela interação do fator tecidual, ligado à membrana e exposto após a lesão. É ativado pelo fator VIIa que é o único iniciador da formação de trombina e fibrina. O complexo tecidual-VIIa ativa o fator IX e X. O fator Xa, sem o seu cofator, apenas transforma pequenas quantidades de protrombina em trombina, necessitando de amplificação.²⁰

Na via extrínseca, os fatores VIII e V são ativados por pequenas quantidades de trombina formadas na fase de iniciação. O fator VIII também é ativado pelo fator VWF. O fator IXa e o VIIIa na superfície dos fosfolípidos e na presença de cálcio, ativa o fator Xa que conjugado

com o fator Va, PL e o cálcio formam um complexo que origina a formação de trombina em grande quantidade que vai atuar no fibrinogénio e formar o coágulo de fibrina.²⁰ Esta via extrínseca é inativada pelo fator inibidor do fator tecidual que vai formar um complexo quaternário com o fator VIIa, TF e Xa.

A análise laboratorial da hemostase inclui a contagem de plaquetas, realizada no hemograma, e os testes e estudos da coagulação.

Os estudos da coagulação são realizados num equipamento automático e analisa-se o tempo de protrombina (PT), o tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT), o tempo de trombina (TT) e o doseamento do fibrinogénio.²⁰

❖ **PT** – avalia os fatores VII, X, V, II e o fibrinogénio. Mede-se o tempo de coagulação do plasma citratado na presença de um fator tecidual sintético com lípidos e cálcio. O valor normal é de 10 a 14 segundos.

Quando existem alterações do PT é porque existe deficiência ou inibição de um ou mais dos fatores que avalia.

É usual ser expresso como INR que é um rácio de normalização internacional que permite comparar resultados interlaboratoriais, quando se pretende monitorizar a terapêutica com anticoagulantes.²⁰

APTT – avalia os fatores VIII, IX, XI e XII e ainda o X, V, protrombina e o fibrinogénio. São adicionados ao plasma um ativador de superfície (ex. caulino), fosfolípidos e cálcio. O tempo normal é de 30 a 40 segundos. Se houver prolongamento desse tempo é porque existe uma inibição de um ou mais fatores ou uma deficiência. A deficiência no fator IX é designada como a doença de Christmas e a do fator VIII como hemofilia.²⁰

❖ **TT** – é sensível à deficiência de fibrinogénio ou à inibição de fibrina. É adicionada trombina bovina diluída ao plasma. A coagulação deve demorar, por norma, 14 a 16 segundos.²⁰

8.6.1. Equipamento STA Compact Max Systems

O equipamento automático STA Compact Max Systems realiza as várias análises e funciona com um sistema de cuvetes que contêm uma esfera metálica que é induzida a oscilar para medir o tempo de coagulação. A deteção da amplitude de oscilação da esfera metálica permite medir a coagulação da amostra pelo método cronométrico. Este sistema é insensível a interferências, como a hemólise, amostras ictericas e lipémicas.³²

8.6.2. Doenças da coagulação – doentes hipocoagulados

Existem muitas alterações da hemostase, como a trombocitopenia que é a diminuição do número de plaquetas quer seja pela insuficiente produção, distúrbios hemorrágicos vasculares, função plaquetária deficiente ou defeitos da coagulação.²⁰

No laboratório tive em permanente contato, enquanto permaneci no setor da coagulação, com amostras de doentes com patologias associadas a defeitos da coagulação e com a terapêutica anticoagulante

Os trombos são massas sólidas formadas por constituintes do sangue e têm importância clínica porque provocam isquémia por obstrução vascular ou embolia. A trombose venosa ou arterial tem uma incidência maior com o aumento da idade e está associada a fatores de risco como cirurgias ou gravidez. Doenças hereditárias ou adquiridas predisõem à trombose e são designados de trombofilia.²⁰

A trombose arterial está intimamente ligada ao processo de aterosclerose enquanto que a venosa, segundo a tríade de Virchow, pode estar relacionada com a lentidão do fluxo sanguíneo, a hipercoagulabilidade sanguínea ou lesão na parede vascular.²⁰

A tendência para a trombose venosa pode ser detetada por parâmetros laboratoriais como o tempo de protrombina e o APTT que estão diminuídos.²⁰

O tratamento desta patologia é feito com o recurso a fármacos anticoagulantes orais, sendo que o mais utilizado é a varfarina que é um antagonista da vitamina K e vai diminuir a expressão dos fatores da coagulação dependestes desta, que são o II, VII, IX e X.²⁰

A dose de varfarina tem de ser ajustada pelo clínico tendo em conta o valor do PT e do INR que é calculado a partir da relação PT do paciente e do PT do controlo elevado ao índice de sensibilidade internacional. Para doentes que façam esta terapêutica o valor alvo de INR é entre 2 e 3.²⁰

No Avelab, como já foi referido, este procedimento é realizado no equipamento automático que indica automaticamente o valor de INR.

8.6.3. Grupos sanguíneos

No setor da coagulação também se realizam os testes para determinar o grupo sanguíneo. Esta determinação é principalmente importante quando é necessário uma transfusão sanguínea.²⁰

Os grupos sanguíneos dependem dos antígenos presentes na superfície do eritrócito, sendo os mais importantes o sistema AB0 e o fator Rh.²⁰

No laboratório realiza-se a determinação dos grupos sanguíneos de forma manual (Anexo 4), ou seja, o sangue do paciente é colocado em contacto com anticorpos anti-A, Anti-B e anti-D e o grupo sanguíneo é determinado pela presença ou ausência de aglutinação (Tabela 7).

Os grupos Rh negativos e os AB precisam de confirmação para que seja dado o resultado. Para confirmar o Rh negativo utilizam-se células lavadas do paciente, adiciona-se reagente de Bliss e coloca-se em banho maria. Ao fim de 30 minutos volta-se a lavar as células com soro, retira-se o sobrenadante e suspende-se os eritrócitos. A suspensão é vista ao microscópio com soro de Coombs e se não ocorrer aglutinação, dá-se como confirmado o Rh negativo.

O grupo sanguíneo AB é confirmado a partir de células lavadas com soro, que são suspensas e ao qual se adiciona, em tubos, anti-A, anti-B e anti-AB, se em todos os tubos ocorrer aglutinação, dá-se o resultado como confirmado.

Tabela 7 - Grupos sanguíneos

Anti-A	Anti-B	Anti-D	Grupo sanguíneo
+	-	+	A Rh positivo
+	-	-	A Rh negativo
-	+	+	B Rh positivo
-	+	-	B Rh negativo
+	+	+	AB Rh positivo
+	+	-	AB Rh negativo
-	-	+	0 Rh positivo
-	-	-	0 Rh negativo

8.6.4. Coombs direto e indireto

O teste de Coombs é utilizado em serologia de grupos sanguíneos e na imunologia geral. O teste de Coombs é usado na triagem de anticorpos no soro do recetor de uma transfusão de sangue e na deteção de anticorpos de grupos sanguíneos em mulheres grávidas Rh negativas com o objetivo de detetar anticorpos anti-Rh em circulação.²⁰

O teste permite avaliar se existe imunoglobulina na superfície dos eritrócitos. Utiliza-se antiglobulina humana produzida em animais, se esta aglutinar os eritrócitos, é porque estes estão revestidos com imunoglobulinas ou elementos do sistema do complemento.²⁰

O teste pode ser realizado de forma direta ou indireta. No laboratório, apenas realizei a forma indireta que deteta os anticorpos livres no soro. Para tal, lava-se as células de um sangue 0 Rh positivo e coloca-se uma gota destas em contato com o soro a testar e deixa-se a incubar durante 60 minutos. Após este tempo, volta-se a lavar as células e após as resuspender adiciona-se uma gota de reagente de Coombs (soro anti-gamaglobulina humana) e observa-se ao microscópio, se existir aglutinação o resultado é positivo, ou seja, existem anticorpos a circular, o que no caso das grávidas, significa que têm anticorpos anti-Rh. Caso o feto seja Rh positivo tem implicações graves como a doença hemolítica perinatal que tem uma elevada taxa de mortalidade e morbidade. Assim, este teste é realizado para que caso seja positivo se possa administrar Ig anti-D às 28 semanas de gestação como forma de prevenção.

9. Conclusão

O estágio no laboratório Avelab permitiu-me pôr em prática os conhecimentos adquiridos durante o Mestrado em Análises Clínicas, aprofundá-los e ter um primeiro contacto com a prática profissional.

O estágio não ocorreu como previsto, tendo sido encurtado devido à pandemia COVID-19, no entanto consegui estar em todos os setores do laboratório. Começando nas salas de colheita, onde tive o primeiro contato com a colheita de amostras e com todo o procedimento pré e pós-colheita, passando depois pela triagem de amostras e por todos os setores do laboratório realizando tarefas analíticas.

Este estágio permitiu-me, evoluir tanto a nível profissional como pessoal, desenvolvendo espírito crítico em relação ao meu trabalho.

Sendo o Avelab, um laboratório de ambulatório, em que são realizadas análises de rotina, tem um papel muito importante na prevenção, controlo e terapêutica de patologias que não necessitam de hospitalização para serem controladas.

10. Bibliografia

1. L. Sepulveda J, Dasgupta - A. ACCURATE RESULTS IN THE CLINICAL A Guide to Error Detection and Correction. Second.; (2019).
2. Assembleia da República. Despacho n.º 10009/2019. Diário da República, 2ª série, N.º 212, 5 de novembro de 2019. (2019);(212):66-80.
3. Laboratórios Clínicos - Requisitos Para a Qualidade e Competência (ISO 15189:2014).
4. Bowen RAR, Hortin GL, Csako G, Otañez OH, Remaley AT. - Impact of blood collection devices on clinical chemistry assays. Clinical Biochemistry. 2010;43(1-2):4-25..2009.10.001
5. Hubl W, Zogbaum M, Boyd JC, et al. - Evaluation of analytical methods and workflow performance of the Architect ci8200 integrated serum/plasma analyzer system. Clínica Chimica Acta. 2005;357(1):43-54.
6. WHO. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>.
7. Barroso H, Silvestre AM, Taveira N. - Microbiologia Médica Vol.2. 1ª edição. Lidel - edições técnicas, lda; (2014);Cap.55 pag. 199-209 .
8. Li Z, Yi Y, Luo X, et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. Journal of Medical Virology. 2020;92(9):1518-1524. doi:10.1002/jmv.25727
9. AUTION MAX™ AX-4030 Brochure. www.arkrayusa.com
10. Carroll KC, Borek AP, Burger C, et al. Evaluation of the BD phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of staphylococci and enterococci. Journal of Clinical Microbiology. Jun 2006, 44 (6) 2072-2077.
11. Menozzi MG, Eigner U, Covan S, et al. Two-center collaborative evaluation of performance of the BD phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of gram-negative bacteria. Journal of Clinical Microbiology. 2006 Nov; 44(11): 4085–4094
12. Kristy Shanahan, Lillian A. - Mundt, Graff' s Textbook of Urinalysis and Body Fluids, 3ª edição, Lippincott Williams & Wilkins, (2016); Cap.6-10 e 15,16 e 18.

13. Strasinger SK, di Lorenzo MS. *Urinalysis and Body Fluids* 6ª edição, F.A. Davis Company, (2014); Cap. 4-6 e 10,14 e 15.
14. Jorge R. Ministério Da Saúde Instituto Nacional de Saúde, *Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas de bacteriologia*; (2004).
15. Tille PM. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, 14ª edição, Elsevier; cap. 68, 72, 73,74 (2018).
16. Barroso H, Silvestre AM, Taveira N. *Microbiologia Médica Vol.I. 1ª edição*. Lidel – edições técnicas, lda; 2014; Cap.21 e 27.
17. Pinheiro, Liliana; Agro, João; Braga, Jorge; Almeida, Alexandra, Sociedade Portuguesa de Neonatologia, *Consenso Clínico - Rastreio e Prevenção Da Doença Perinatal Causada Pelo Agalactiae*, (2016). www.spneonatologia.pt/wp-content/uploads/2016/11/2013-StreptoB.pdf
18. Águas Fernanda, Silva Daniel Pereira. Sociedade Portuguesa de Ginecologia. *Revisão dos consensos em infeções vulgovaginais*, (2012). <http://www.spginecologia.pt/noticias-da-spg/revisao-dos-consensos-em-infeccoes-vulgovaginais.html>
19. World Health Organization. *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*. World Health Organization; 5ª edição, (2010). <https://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/9789241547789/en/>
20. Hoffran A. Vitor, Moss, Paul A. H., - *Hoffbrand's Essential Haematology*, 7ª edição, Wiley Blackwell, (2015); Cap. 1-3, 15, 24-26 e 30.
21. VanPutte C, Regan J, Russo A. - *Anatomia e Fisiologia de Seeley - 10ª Edição*, (2016).
22. DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE - *Prescrição e Determinação Do Hemograma* www.dgs.pt
23. Bain BJ, Bates I, Laffan MA, Lewis SM, Shirley M. - *Dacie and Lewis Practical Haematology*; 12 edição, Elsevier, (2017); Cap 5.
24. Leers MPG, Goertz H, Feller A, Hoffmann JJML. - *Performance evaluation of the Abbott CELL-DYN Ruby and the Sysmex XT-2000i haematology analysers*. *International Journal of Laboratory Hematology*. (2011), Feb;33(1):19-29. doi: 10.1111/j.1751-553X.2010.01230.x. PMID: 20402823

25. Tishkowsky K G v. - Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR) (StatPearls Publishing; 1 ed.); (2020). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557485>
26. STARSED COMPACT USER MANUAL. <http://www.mechatronics.nl>
27. Direção Geral de Saude. Prescrição e Determinação Da Hemoglobina Glicada A1, (2011). www.dgs.pt
28. Badiou S, Guillot J, Kuster N, et al. - Comparison of Arkray/ELITech ADAMS HA-8180V® with Bio-Rad Variant,TMII Turbo2.0® and Tosoh Bioscience HLC®-723G8 for HbA1c Determination. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. (2014); pág. 428-434
29. Urrechaga E. - Analytical evaluation of the ADAMS™ A1c HA8180T analyzer for the measurement of HbA1c. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. (2018), 32:e22155
30. Piaton E, Fabre M, Goubin-Versini I, et al. Guidelines for May-Grünwald–Giemsa staining in haematology and non-gynaecological cytopathology: recommendations of the French Society of Clinical Cytology (SFCC) and of the French Association for Quality Assurance in Anatomic and Cytologic Pathology (AFAQAP). *Cytopathology*. (2016), pág. 359-368;
31. WHO. Haemoglobin Concentrations for the Diagnosis of Anaemia and Assessment of Severity. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85839/WHO_NMH_NHD_MNM_11.1_eng.pdf
32. FDA, STA Compact Max. www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf13/K130090.pdf
33. DGS, Ministério Da Saúde Direcção-Geral Da Saúde Circular Normativa Assunto: Profilaxia Da Isso imunização Rh. <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/circular-normativa-n-2dsmia-de-15012007-pdf.aspx>

II. Anexos

Anexo I - Análises realizadas nos equipamentos i2000SR e i1000.

EQUIPAMENTO	ANALISES REALIZADAS
I 1000	Hepatite A – IgM/IgG, Ácido valpróico, Ac HBc Total, Carbamazepina, Ac Anti-Ag e Ac-Hbe, Peptídeo C, Ac IgM Anti-Core HBC, Digoxina, Homocisteína, Fenobarbital, Covid-19 IgG, Fenitoína.
I2000SR	FT3, Ac Anti-HIV 1 e 2 e Ag p24, T3, AFP, T4, HBI Ac, FT4, Ac Anti-HCV IgG Total, PTH, Ac anti-tiroglobulina, TSH, Ac anti-peroxidase, Beta-hCG, CA 125, Cortisol, Testosterona total, DHEA-S, Estradiol, Ferritina, Vit. B12, HBs Ag, CA 19.9, Troponina I, CEA, Insulina, IgM/IgG CMV, Mioglobina, Ácido fólico, 25(OH)Vit.D, PSA livre, FSH, IgG/IgM Rubéola, LH, PSA total, Progesterona, IgG/IgM <i>Toxoplasma gondi</i> , Prolactina.

Anexo 2 - Equipamento Phoenix: painéis de antibióticos usados na TSA

TIPO DE PAINEL	ANTIBIÓTICOS
UNMIC/ID-409	Amoxicilina/ácido clavulânico; Ampicilina; Cefepime; Amicacina; Ceftazidime; Cefoxitin; Ceftriaxone; Cefuroxime; Ciprofloxacina; Ertapenem; Fosfomicina; Gentamicina; Imipenem; Meropenem; Nitrofurantoina; Norfloxacina; Piperacilina/Tazobactam; Temocilina; Trimetroprim; ESBL.
SMIC/ID-11	Amoxicilina; Cloranfenicol; Cefepime; Clindamicina; Daptomicina; Cefotaxime; Cefuroxime; Eritromicina; Gentamicina; Levofloxacina; Linezolid; Meropenem; Moxifloxacina; Penicilina; Teicoplanina; Pristanamicina; Tetraciclina; Trimetroprim/sulfametoxazol; Vancomicina.
PMIC/ID-88	Ampicilina; Cefoxitin; Ceftarolina; Ciprofloxacina; Clindamicina; Daptomicina; Eritromicina; Fosfomicina; Ácido fusídico; Gentamicina; Gentamicina-Synergy; Imipenem; Teste de resistência a macrólidos; Linezolina; Beta-lactamase; Moxifloxacina; Mupirocin; Nitrofurantoína; Oxacilina; Penicilina; Rifampicina; Teicoplanina; Tetraciclina; Tigeciclina; Trimetroprim/sulfametoxazole; Vancomicina.

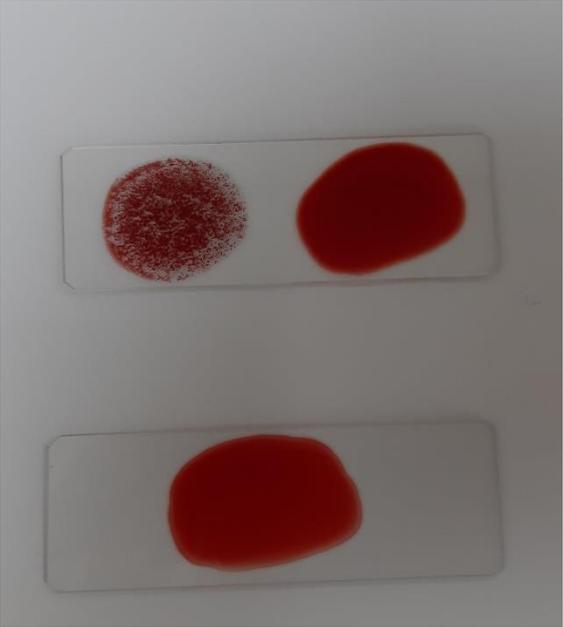
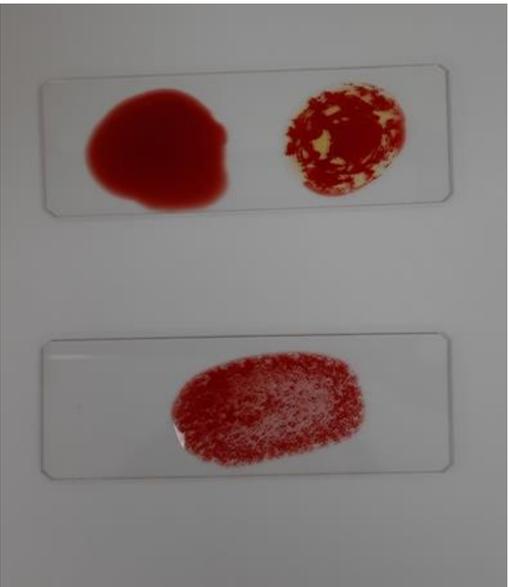
NMIC/ID-415

Amicacina; Aztreonam; Cefepime; Colistina; Cefotaxime;
 Ciprofloxacina; Gentamicina; Levofloxacina; Meropenem;
 Minociclina; Piperacilina; Piperacilina/Tazobactam; Ticarcilina;
 Ticarcilina/clavulanato; Tobramicina; Trimetropim/sulfametoxazol;
 ESBL.

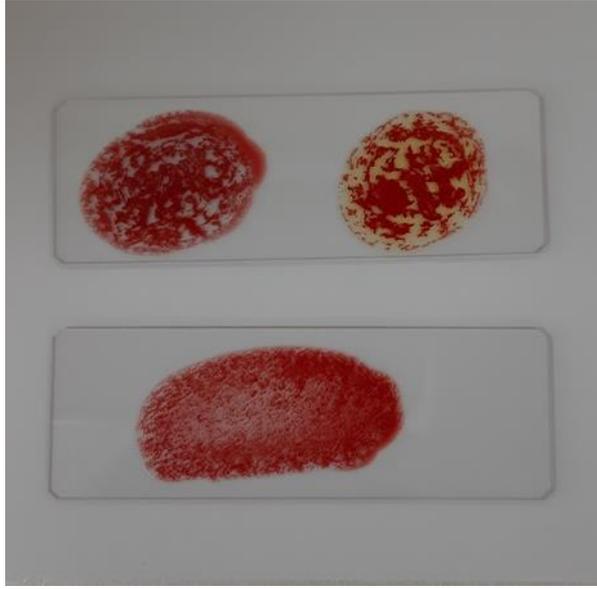
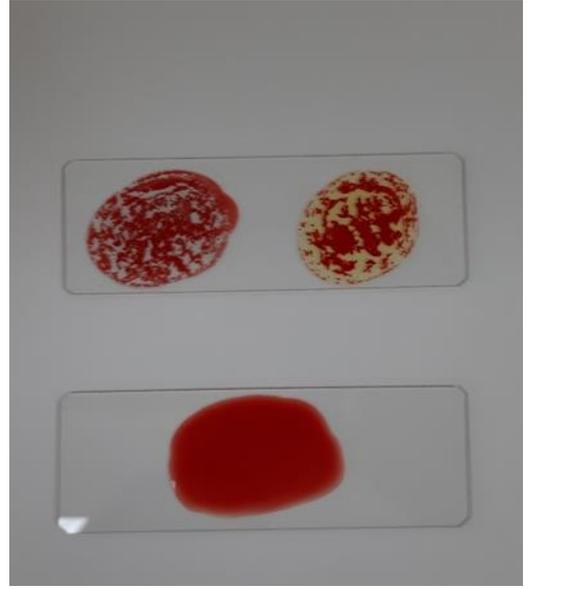
Anexo 3 - Valores de referência do hemograma

Parâmetro (Unidades)	Sexo	Idade	Valor Referência	Valores Críticos	
				Baixo	Alto
RBC (x 10 ¹² /L)	M/F	0-6 Meses	3.90 – 5.90	Não há	Não há
	M/F	6 Meses-11 Anos	3.80 – 5.40		
	M	> 11 Anos	4.31 – 6.40		
	F	> 11 Anos	3.85 – 5.20		
HGB (g/dL)	M/F	0-6 Meses	14.0 – 18.0	<10.0	> 19.9
	M/F	6 Meses-11 Anos	11.0 – 14.0		
	M	> 11 Anos	13.6 – 18.0		
	F	> 11 Anos	11.5 – 16.0		
HTC (%)	M/F	0-2 Semanas	42.0 – 68.0	< 30.0	> 61.0
	M/F	2 Sem. - 2 Meses	35.0 – 50.0		
	M/F	2 Meses - 1 Ano	30.0 – 40.0		
	M/F	1 - 5 Anos	32.0 – 42.0		
	M	> 5 Anos	39.8 – 52.0		
	F	> 5 Anos	34.7 – 46.0		
MCV (fL)	M/F	0-2 Semanas	88.0- 114.0	Não há	Não há
	M/F	2 sem. -6 Meses	85.0 – 97.0		
	M/F	6 Meses - 11 Anos	72.0 – 86.6		
	M/F	> 11 Anos	80.0 – 97.0		
MCH (pg)	M/F	0-2 Semanas	34.0 – 37.0	Não há	Não há
	M/F	2 sem. -6 Meses	31.0 – 36.0		
	M/F	6 Meses - 5 Anos	25.0 – 31.0		
	M/F	> 5 Anos	26.0 – 34.0		
MCHC (g/dL)	M/F	0-2 Semanas	31.0 – 35.0	Não há	Não há
	M/F	2 sem. -6 Meses	32.0 – 35.0		
	M/F	> 6 Meses	32.0 – 36.0		
RDW (%)	M/F	0-2 dias	14.9 – 18.7	Não há	Não há
	M/F	> 2 dias	11.5 – 15.0		
PLT (x 10 ⁹ /L)	M/F	0-2 Meses	140 - 440	< 100	> 1000
	M/F	> 2 Meses	140 - 440		
MPV (fL)	M/F	Qualquer Idade	6.5 – 12.4	Não há	Não há
WBC (x 10 ⁹ /L)	M/F	0-2 Meses	5.0 – 20.0	< 1.0	> 30.0
	M/F	2 Meses-5 Anos	4.5 – 17.0		
	M/F	5 - 11 Anos	4.5 – 13.0		
	M/F	> 11 Anos	4.0 – 10.0		
NEU (x 10 ⁹ /L)	M/F	0-6 dias	1.5 – 16.0	< 0.50	Não há
	M/F	6 dias -2 Meses	0.8 – 9.0		
	M/F	2 Meses – 1 Ano	0.7 – 7.6		
	M/F	1 – 5 Anos	1.5 – 11.0		
	M/F	5 - 11 Anos	1.5 – 8.5		
	M/F	> 11 Anos	1.5 – 8.0		
LYM (x 10 ⁹ /L)	M/F	0-6 dias	0.5 – 10.0	Não há	Não há
	M/F	6 dias -5 Anos	2.0 – 14.0		
	M/F	5 - 11 Anos	1.0 – 7.8		
	M/F	> 11 Anos	0.8 – 4.0		
MONO (x 10 ⁹ /L)	M/F	0-2 Meses	0.0 – 2.4	Não há	Não há
	M/F	2 Meses-5 Anos	0.0 – 2.0		
	M/F	5 - 11 Anos	0.0 – 1.6		
	M/F	> 11 Anos	0.0 – 1.2		
EOS (x 10 ⁹ /L)	M/F	0-2 Meses	0.0 – 1.4	Não há	Não há
	M/F	2 Meses-5 Anos	0.0 – 1.2		
	M/F	5 - 11 Anos	0.0 – 0.9		
	M/F	> 11 Anos	0.0 – 0.3		
BASO (x 10 ⁹ /L)	M/F	0-2 Meses	0.0 – 0.6	Não há	Não há
	M/F	2 Meses-5 Anos	0.0 – 0.5		
	M/F	5 - 11 Anos	0.0 – 0.4		
	M/F	> 11 Anos	0.0 – 0.3		

Anexo 4 - Imagens das lâminas na determinação dos grupos sanguíneos

Grupo sanguíneo A positivo	Grupo sanguíneo A negativo
	
Grupo sanguíneo B positivo	Grupo sanguíneo B negativo
	

Anexo 4 - Imagens das lâminas na determinação dos grupos sanguíneos (continuação)

Grupo sanguíneo AB positivo	Grupo sanguíneo AB negativo
	
Grupo sanguíneo O positivo	Grupo sanguíneo O negativo
