



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Jéssica Monteiro Fonseca

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 Américo Freitas e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2023



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Jéssica Monteiro Fonseca

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 Américo Freitas e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2023

Agradecimentos

Primeiramente, quero agradecer aos meus pais por me darem a oportunidade de seguir os meus sonhos e de ter chegado até aqui, sem eles não era possível. Um obrigada por todos os sacrifícios, pela compreensão, pelo apoio e por estarem sempre disponíveis para tudo. Agradecer à minha irmã por toda a paciência e por toda ajuda ao longo do meu percurso académico. Ao meu irmão, que apesar de pequenino teve um papel importante ao encher os meus dias com alegria.

Quero agradecer ao meu namorado, por toda a paciência e pelo apoio incondicional que me deu ao longo destes anos no meu percurso académico, que teve sempre presente e que nunca me deixou ir abaixo nem a desistir.

Um agradecimento ao Dr. Américo Freitas e a toda a equipa do laboratório Avelab por me darem a oportunidade de estagiar durante 6 meses e por me terem fornecido as condições necessárias para a realização do meu estágio e terem transmitido toda a sabedoria tanto a nível pratico como teórico e além do meu desenvolvimento profissional permitiram o meu desenvolvimento pessoal.

Um agradecimento à minha orientadora Maria do Céu Sousa por toda a orientação e disponibilidade para a realização do meu relatório. E um agradecimento à coordenadora do Mestrado em Análises Clínicas, Ana Miguel Matos, por toda a disponibilidade e ajuda que forneceu ao longo do mestrado.

Por fim, mas não menos importante quero agradecer aos meus amigos por toda a paciência e por todos os conselhos, em especial à Rita e à Vanessa que foram as pessoas que estiveram sempre presentes e que foram um apoio incondicional. Um agradecimento em especial à Liliana, que tive a oportunidade de conhecer na realização do Mestrado e que para além de uma colega se tornou uma amiga que vou levar para a vida.

Um obrigada a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para que tivesse chegado até aqui!

Índice

Introdução	1
1. Caraterização do Laboratório Avelab	1
2. Processamento das amostras	3
2.1. Fase pré analítica.....	3
2.2. Fase analítica	4
2.3. Fase pós analítica	4
3. Controlo da qualidade	5
3.1. Controlo de qualidade interno (CQI)	5
3.2. Avaliação externa da qualidade (AEQ).....	5
4. Bioquímica	6
5. Imunologia	6
6. Biologia Molecular	7
7. Microbiologia	7
7.1. Exame macroscópico.....	8
7.2. Exame microscópico direto	8
7.2.1. Exame a fresco	8
7.2.2. Coloração de Gram	8
7.2.3. Coloração de Ziehl-Neelsen.....	9
7.2.4. Método do hidróxido de potássio (KOH).....	9
7.2.5. Coloração com azul de lactofenol.....	9
7.3. Exame Cultural.....	10
7.4. Provas de identificação	11
7.5. Identificação e antibiograma.....	12
7.6. Processamento de amostras	13
7.6.1. Urina.....	14
7.6.2. Fezes	17
7.6.3. Exsudatos retais, vaginais e uretrais	20
7.6.4. Exsudados de orofaringe e nasofaringe	24
7.6.5. Expetoração	26
7.6.6. Exsudatos purulentos: feridas e tecidos moles	28
7.6.7. Exame micológico em unhas, cabelos e pele.....	31
7.7. Serologia infecciosa	32
7.7.1. VDRL e TPHA.....	32
8. Hematologia	33
8.1. Testes Laboratoriais	34
8.1.1. Hemograma	34
8.1.2. Velocidade de sedimentação (VS).....	36

8.1.3. Esfregaço do sangue periférico.....	37
8.1.3.1. Coloração de Leishman.....	37
8.1.4. Hemoglobina glicada (HbA1C).....	37
8.2. Patologias associadas a alterações dos componentes sanguíneos.....	38
8.2.1. Anemia.....	38
8.2.1.1 Anemia por deficiência de ferro.....	38
8.2.2. Leucemia mieloide crónica (LMC).....	40
8.3. Hemostase e coagulação	41
8.3.1. Distúrbios da coagulação e terapia anticoagulante.....	43
8.4. Imunohematologia	44
8.4.1. Determinação dos grupos sanguíneos.....	45
8.4.2. Teste de Coombs direto e indireto.....	46
9. Conclusão	49
10. Bibliografia	51

Abreviaturas

H₂S - Sulfato de hidrogénio

AEQ - Avaliação externa da qualidade

ANA - Anticorpo antinuclear

ANCA - Anticorpo anticitoplasmático

APTT - Tempo de tromboplastina parcial ativado

BAAR - Bacilo álcool-ácido resistente

CAM - Gelose Campyloset

CET - Ágar Cetrimida

CHGM - Concentração da Hemoglobina globular média

CLED - Gelose Cistina-Lactose-Deficiente de Eletrólitos

CMI - Concentração mínima inibitória

CQI - Controlo de qualidade interno

DD - D-dímeros

DGS - Direção-Geral de Saúde

DM - Diabetes *Mellitus*

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*

ESBL - *Extended-spectrum beta-lactamase*

EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

HbA1C - Hemoglobina glicada

HbA2 - Hemoglobina A2

HbF - Hemoglobina fetal

HCM - Hemoglobina corpuscular média

HCT - Hematócrito

HGB - Hemoglobina

IgG - Imunoglobina G

IgM - Imunoglobina M

INR - *International normalized ratio*

ITU - Infecções do trato urinário

KOH - Hidróxido de potássio

LDH - *Lactate Dehydrogenase* (em português- Lactato desidrogenase)

LMC - Leucemia mieloide crónica

MRSA - *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

PCR - *Polymerase chain reaction* (em português- Reação em cadeia de polimerase)

PLT - Plaquetas

PT - *Prothrombin Time*

qPCR - *Real-time polymerase chain reaction* (em português- Reação em cadeia de polimerase em tempo real)

RBC - *Red blood cell* (em português- Eritrócitos)

RDW - *Red blood cell distribution width* (em português- Distribuição do volume eritrocitário)

RET - Reticulócitos

RIQAS - *Randox International Quality Assessment Scheme*

RT-qPCR - *Reverse transcription real-time polymerase chain reaction* (em português Reação em cadeia de polimerase da transcrição reversa em tempo real)

SARS-CoV2 - *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*

SLS - Sulfato de Lauril de sódio

SS - *Gelose Salmonella-Shigella*

Strep A - *Streptococcus* do grupo A

TPHA - *Treponema pallidum Hemagglutination Assay*

TT - Tempo de trombina

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

VCM - Volume corpuscular médio

VDRL - *Venereal Disease Research Laboratory*

VS - Velocidade de sedimentação

VWF - *Von Willebrand factor*

WBC - *White blood cells* (em português-Células brancas)

Resumo

O presente relatório tem como objetivo descrever as atividades desenvolvidas ao longo do estágio curricular do âmbito do Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. O estágio, com duração de 6 meses, teve lugar no Laboratório Médico de Análises Clínicas Avelab localizado na cidade de Aveiro.

Os serviços prestados num laboratório de análises clínicas é da responsabilidade dos profissionais de saúde, por isso é importante que o laboratório tenha profissionais qualificados para as metodologias usadas, para a interpretação e validação dos resultados. Com a evolução da ciência e da tecnologia, os laboratórios de análises clínicas têm tido uma evolução e por isso os procedimentos estão cada vez mais automatizados, o que permite reduzir o número de erros do operador e permite efetuar um maior número de análises num tempo de resposta curto. Mas o papel dos profissionais continua a ser indispensável, porque todos os procedimentos têm de ser supervisionados e validados.

Ao longo do estágio tive contacto com as áreas de Microbiologia, Bioquímica, Imunologia, Hematologia e Biologia Molecular. O relatório aborda em particular as áreas de Microbiologia e Hematologia, sendo referidos os exames realizados, as diferentes metodologias usadas, os equipamentos presentes no laboratório, a interpretação e validação dos resultados. Também apresenta os procedimentos analíticos do laboratório e os controlos de qualidade que são fundamentais para garantir a qualidade dos resultados obtidos.

Palavras-chave: Análises Clínicas; Diagnóstico Laboratorial; Microbiologia; Hematologia; Avelab.

Abstract

This report aims to describe the activities developed during the curricular internship under the Master of Clinical Analysis of the College of Pharmacy of the University of Coimbra. The internship, lasting 6 months, took place at the Avelab Clinical Analysis Medical Laboratory located in the city of Aveiro.

The services provided in a clinical analysis laboratory are the responsibility of health professionals, so it is important that the laboratory has qualified professionals for the methodologies used, for the interpretation and validation of the results. With the evolution of science and technology, clinical analysis laboratories have evolved and therefore procedures are increasingly automated, which reduces the number of operator errors and allows a greater number of analyzes to be performed in a short response time. But the role of professionals remains indispensable because all procedures must be supervised and validated.

Throughout the internship I had contact with Microbiology, Biochemistry, Immunology, Hematology and Molecular Biology. The report addresses the areas of Microbiology and Hematology, being referred to the tests performed, the different methodologies used, the equipment present in the laboratory, the interpretation and validation of the results. It also presents the analytical procedures of the laboratory and the quality controls that are essential to ensure the quality of the results obtained.

Keywords: Clinical Analysis; Diagnostic Laboratory; Microbiology; Hematology; Avelab.

Introdução

As análises clínicas são um meio complementar de diagnóstico, uma vez que através da recolha de material biológico e da sua análise é possível detetar anomalias e patologias e por isso são indispensáveis para o diagnóstico, prevenção e na monitorização de tratamento de doenças.

O estágio curricular do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Coimbra é crucial para a formação dos alunos, uma vez que estabelece a ligação entre os conhecimentos teóricos com a prática diária de um laboratório de diagnóstico clínico. Além disso, permite o acesso a todas as áreas de um laboratório de análises clínicas como a Hematologia, Bioquímica, Microbiologia e Imunologia, acompanhando todo o processo analítico desde a fase pré-analítica até à fase pós-analítica.

O meu estágio foi realizado no Laboratório Médico de Análises Clínicas Avelab em Aveiro, sob a orientação do Dr. Américo Freitas o qual, juntamente com o pessoal clínico, foi crucial para a minha formação profissional. O estágio teve a duração de 6 meses e foi dividido em seis áreas: Microbiologia; Biologia Molecular; Urianálise/Serologia Infeciosa; Hematologia, Imunohematologia, Trombose e Hemostase; Imunoquímica e Imunologia/ Triagem. O tempo de permanência em cada uma das áreas foi de um mês.

Desta forma, este relatório tem como objetivo descrever o meu estágio curricular no laboratório Avelab destacando as áreas de Microbiologia e de Hematologia.

I. Caracterização do Laboratório Avelab

O laboratório Avelab foi criado em 1956 em Aveiro e é constituído pelo laboratório central que presta serviços para a comunidade nas áreas da Hematologia, Microbiologia, Bioquímica e Imunologia. Encontra-se sediado em Aveiro e é um edifício com quatro pisos os quais são constituídos por um armazém, uma sala de pausa, uma sala de receção aos utentes, salas de colheitas, gabinetes médicos de validação, áreas administrativas, sala de triagem e os laboratórios de Bioquímica, Microbiologia, Imunologia e Biologia Molecular. O laboratório tem um horário de funcionamento de segunda a sexta das 7:30h às 19:00h e aos sábados das 8:00h às 13:00h, embora as colheitas sejam feitas apenas na parte da manhã.

A direção clínica é constituída pelos médicos especialistas Dr. Alberto Ferreira Neves, Dr. Américo Freitas e Dr. Teresa Raposo e pelos farmacêuticos especialistas Dr. António Ferreira Neves, Dra. Irene Sá e Dra. Lurdes Pereira.

O laboratório Avelab tem também vários postos de colheita distribuídos por vários concelhos da região centro e norte de Portugal. Oferece também serviço ao domicílio, com marcação prévia, efetuando análises para lares de idosos e gabinetes de Medicina do trabalho. Todas as amostras são transportadas para o laboratório central em arcas refrigeradas e com as condições de transporte adequadas.

O laboratório Avelab está equipado com vários equipamentos automatizados (Tabela I) que permitem obter um maior número de resultados num tempo de resposta curto. Para além disso, o laboratório possui frigoríficos e congeladores para a preservação de amostras, controlos, reagentes e calibradores. Possui outros equipamentos que são necessários na rotina diária como as estufas, centrifugas e microscópios óticos. De forma a garantir a rastreabilidade das amostras, o laboratório possui um sistema informático, o Apollo 3, na rede dos computadores que se encontra interligado com os aparelhos automáticos. Este sistema em rede é crucial para controlar o processo analítico, desde a receção dos produtos biológicos até ao arquivo das mesmas e da emissão dos resultados.

Tabela I| Equipamentos automatizados presentes no laboratório Avelab, estando agrupados por sectores.

Sector	Equipamentos	Quantidade
Microbiologia	SediMAX conTRUST	1
	VITEK 2 compact	1
	Unamax	2
Biologia Molecular	SSNP-2000B Nucleic Acid Extraction System da Bioperfectus	2
	GenoXtract	6
	FluoroCycler XT	2
	FluoroCycler 12	1
	STC-96 PLUS Real-time PCR System	1
Hematologia	Sysmex XN-2000	1
	VES-MATIC CUBE 30	2
	HbNext	2
	STA Compact Max	2
	Ortho Biovue Systems	1
Bioquímica	Alinity c-series	2
	Capillarys Sebia 2	1
Imunologia	Allinity i-series	2
	Phadia 250	1
	HCBT-01 Breath Test analyzer	1

2. Processamento das amostras

Os resultados emitidos pelos laboratórios de análises clínicas desempenham um papel muito importante na tomada de decisões clínicas. Desta forma, é fundamental garantir a qualidade dos resultados emitidos pelo laboratório¹.

O procedimento analítico das amostras divide-se em três fases: a fase pré-analítica, fase analítica e fase pós analítica^{1,2}. As fases analíticas devem ter um controlo rigoroso de forma a garantir a qualidade dos procedimentos realizados e dos resultados emitidos, uma vez que a tomada de decisões clínicas é, maioritariamente, baseada nos exames laboratoriais e por isso é fundamental que os mesmos sejam fidedignos e que não ocorram erros.

2.1. Fase pré analítica

A fase pré analítica é a fase em que é mais frequente ocorrerem erros, representando cerca de 70% dos erros que ocorrem no laboratório². Esta fase diz respeito a todos os procedimentos que antecedem a análise da amostra. Os principais erros que ocorrem nesta fase correspondem à má preparação do utente, à incorreta colheita, o que pode resultar em amostras hemolisadas, coaguladas e com volume insuficiente, ao mau acondicionamento das amostras durante o transporte e à incorreta preparação da amostra^{2,3}.

O laboratório Avelab fornece a formação necessária aos técnicos e tem procedimentos padronizados para evitar a ocorrência destes erros. No laboratório esta fase tem início na receção, onde os utentes se dirigem com a requisição médica e as suas análises são registadas no sistema informático Apollo 3 e este gera, automaticamente, um código que irá acompanhar o processo de cada utente. De seguida, é explicado ao utente, se necessário, as medidas que este deve ter em atenção para a colheita, como por exemplo se tem de estar em jejum. Após estes procedimentos, o utente é encaminhado para a sala de colheitas, para a colheita de amostras biológicas seguindo as normas da Direção-Geral de Saúde (DGS). Antes de iniciar a colheita, as etiquetas geradas pelo sistema informático são coladas nos respetivos tubos de forma a evitar trocas de amostras. As etiquetas apresentam um código alfanumérico, com duas letras que correspondem às iniciais do local da colheita, cinco números que correspondem à identificação do utente e por último os números da extensão dos diferentes setores para onde irá a amostra.

As amostras são encaminhadas para a sala de triagem onde as amostras do setor de bioquímica são triadas e preparadas no sistema Apollo 3. As restantes amostras são distribuídas pelos diferentes setores onde se realizam as respetivas triagens. Esta fase da triagem é fundamental porque permitir verificar se todas as amostras reúnem as condições

necessárias para análise, isto é, se estão corretamente armazenadas, identificadas e com o respetivo número mecanográfico, se apresentam o volume necessário, hemólise e se estão coaguladas. Se não apresentarem as condições necessárias, a amostra não é processada e é registada essa informação para que se possa repetir a colheita da amostra.

As amostras do sector de bioquímica são centrifugadas e são retiradas alíquotas que são usadas para análises noutros setores como o *Venereal Disease Research Laboratory* (VDRL), anticorpo antinuclear (ANA) e anticorpo anticitoplasmático de neutrófilo (ANCA) e também são retiradas alíquotas para análises que são realizadas em laboratórios externos, como a Cerba e a Ambar que são laboratórios sediados em Barcelona.

2.2. Fase analítica

A fase analítica engloba os processos que estão envolvidos diretamente na análise das amostras². Os processos envolvidos na fase analítica abrangem a verificação e preparação dos equipamentos, nomeadamente a nível de reagentes, de calibradores e dos controlos².

Os erros que ocorrem nesta fase são muito menores do que nas restantes fases analíticas e isto acontece devido às análises serem maioritariamente automatizadas e devido à implementação de controlos de qualidade internos que permitem garantir a qualidade dos resultados². Os principais erros que ocorrem dizem respeito a problemas do equipamento, à incorreta calibração e à não conformidade com o controlo interno de qualidade. Também podem surgir problemas devido a pipetagens incorretas, reagentes contaminados, presença de coágulos de fibrina e amostras com volume insuficiente².

2.3. Fase pós analítica

A fase pós analítica consiste na validação e na transmissão dos resultados ao utente e ao clínico que irá interpretar as análises^{2,3}. Os principais erros que ocorrem advêm de atrasos que ocorrem na fase analítica, em que as análises pedidas não são efetuadas, que pode ocorrer devido a avaria de equipamentos ou falta de reagentes. Em adição, podem ocorrer atrasos nas requisições de análises e no processamento dos relatórios, devido a requisições ou amostras perdidas. Também podem suceder erros na interpretação dos resultados devido a enganos na introdução de resultados manuais².

No laboratório Avelab a validação passa por duas fases, a validação analítica que é realizada pelo técnico responsável pelo setor e que verifica a conformidade das condições de execução dos procedimentos e tem por base os resultados do controlo de qualidade interno³. Posteriormente, é realizada a validação biopatológica pelos especialistas, médicos ou

farmacêuticos, que consiste em garantir a coerência dos resultados com história clínica do utente³.

No fim da análise das amostras, estas são armazenadas em condições apropriadas de forma a garantir a sua conservação até que sejam eliminadas.

3. Controlo da qualidade

A garantia da qualidade engloba todas as ações que são necessárias para que o serviço prestado pelo laboratório apresente resultados fidedignos e por isso é crucial assegurar a qualidade de todas as fases do processo analítico bem como assegurar a qualidade dos procedimentos de controlo, nomeadamente do controlo de qualidade interno (CQI) e da avaliação externa da qualidade (AEQ)³.

3.1. Controlo de qualidade interno (CQI)

O CQI permite controlar a qualidade dos resultados emitidos ao longo de todo o processo analítico e permitir a deteção anomalias, a avaliação de erros e a sua imediata correção³.

No laboratório Avelab o controlo de qualidade interno é realizado diariamente ou quando existe uma mudança de lote de reagentes. Este é processado nos diferentes equipamentos antes de se iniciar o processamento das amostras.

São fornecidos pelas casas comerciais três níveis de controlo, mas apenas dois controlos são analisados diariamente, sendo usados alternadamente os três no dia-a-dia. Os resultados dos controlos são emitidos em forma numérica e graficamente e são realizadas cartas de controlo que são analisadas segundo as regras de Westgard⁴. O controlo é analisado perante a regra de dois desvios padrão (2SD), ou seja, é rejeitado se dois valores consecutivos excederem dois desvios padrão ($\pm 2SD$). Nesta situação é necessário tomar medidas corretivas de forma a resolver este problema, como por exemplo calibrar o equipamento⁴. Após a resolução do problema, os controlos são novamente analisados e se os valores estiverem dentro da normalidade pode-se iniciar a análise das amostras.

3.2. Avaliação externa da qualidade (AEQ)

O laboratório para além dos controlos de qualidade interno tem de participar em programas de avaliação externa da qualidade ou em ensaios interlaboratoriais de forma a garantir a qualidade dos resultados emitidos³.

No laboratório Avelab a avaliação externa da qualidade é realizada por dois programas a *Randox International Quality Assessment Scheme (RIQAS)* e o *United Kingdom National External Quality Assessment Service (UK NEQAS)*. Os controlos são enviados para o laboratório e são

analisados como uma amostra normal, uma vez que os resultados não são conhecidos. Os resultados obtidos são analisados por especialistas e são comparados com resultados obtidos por outros laboratórios³. Se os resultados obtidos não são os esperados, a entidade comunica o laboratório e devem ser implementadas medidas corretivas.

O laboratório Avelab é certificado pela Norma ISO 9001 pela Bureau Veritas Certification de forma a garantir que o laboratório se encontra dentro das conformidades requisitadas.

4. Bioquímica

No sector de bioquímica realiza-se a análise de diversos parâmetros bioquímicos em amostras de plasma, soro e urina para avaliação da função tiroideia, renal, hepática, cardíaca, do perfil lipídico, do equilíbrio eletrolítico entre outros permitindo detetar a presença de distúrbios no organismo e para além disso, permite monitorizar e prevenir o desenvolvimento de patologias.

A área de bioquímica encontra-se muito automatizada, sendo que o equipamento usado no laboratório é o Alinity ci-series que tem incorporado um modulo de bioquímica e um módulo de imunologia. Diariamente são realizados os controlos, mas a calibração só é realizada quando ocorrem alertas no aparelho ou quando existe alguma alteração nos controlos, com exceção de alguns parâmetros como por exemplo em relação ao ionograma em que a calibração tem de ser realizada diariamente.

No laboratório de bioquímica também se encontra o equipamento Capillarys Sebia 2 que realiza a eletroforese capilar das proteínas e o equipamento HCBT-01 Breath Test analyzer que deteta o *Helicobacter pylori* nos exames respiratórios.

Durante o meu estágio tive a oportunidade de colocar os reagentes e os controlos dos equipamentos e realizar a interpretação das cartas de controlo, tal como tive oportunidade de interpretar os resultados laboratoriais e observar a validação realizada pelo técnico responsável.

5. Imunologia

A área de Imunologia no laboratório Avelab não apresenta um setor em específico, uma vez que as análises são distribuídas pelos diferentes setores do laboratório. As análises de imunologia avaliam parâmetros que permitem o estudo de alergias, endocrinologia, anemia, serologia infecciosa, autoimunidade, pesquisa e monitorização de marcadores tumorais e de medicamentos e pesquisa de drogas de abuso. Grande parte da análise dos diferentes parâmetros são realizadas no Alinity ci-series, modulo de imunologia, que se encontra no

laboratório de bioquímica. As análises de alergénicos e autoimunidade são realizadas no equipamento Phadia 250.

6. Biologia Molecular

A introdução de métodos de biologia molecular nos laboratórios clínicos é fundamental para que o diagnóstico seja mais sensível e específico e seja realizado no menor espaço de tempo possível. No departamento de Biologia Molecular do laboratório Avelab é realizada a técnica de da *Real-time polymerase chain reaction* (qPCR) e são executadas diferentes análises como a deteção qualitativa de *Neisseria gonorrhoeae*, de *Mycobacterium tuberculosis*, de *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA), de Herpes simplex I e 2, do Vírus do Papiloma Humano (HPV), de *Chlamydia trachomatis*, de HLA-B27 e da posição -1390 na região promotora do gene humano da lactase e é realizado um multiplex de patógenos envolvidos nas doenças sexualmente transmissíveis. Também é realizada a deteção qualitativa de SARS-CoV2 por *Reverse transcription real-time polymerase chain reaction* (RT-qPCR).

7. Microbiologia

A microbiologia é a ciência que estuda os microrganismos, como bactérias, parasitas, vírus e fungos^{6,7}. O organismo humano encontra-se colonizado por uma grande diversidade de microrganismos denominado por microbioma ou microbiota que desempenha um papel vital na saúde humana. A composição do microbiota é influenciada por diversos fatores e quando há uma alteração com perda das suas propriedades funcionais, pode ocorrer disbiose e consequentemente desenvolver-se doença devido à eliminação de microrganismos necessários ao equilíbrio ou permitindo o crescimento de bactérias ou outros microrganismos que são patógenos. As doenças provocadas por agentes patogénicos são denominadas de doenças infecciosas e são consideradas das principais causas de morte no mundo, sendo responsáveis por mais de 13 milhões de mortes entre crianças e jovens adultos. Cerca de metade deste número de mortes ocorre nos países em desenvolvimento, mas todas as regiões no mundo sofrem regularmente surtos de algum tipo de doença infecciosa. Desta forma, o laboratório de microbiologia é fundamental para a deteção dos microrganismos, diagnóstico e controlo de doenças infecciosas e também para a avaliação da suscetibilidade dos microrganismos aos antibióticos.

No laboratório de microbiologia do Avelab são processadas análises bacteriológicas, micológicas e parasitológicas. Durante o meu estágio tive a oportunidade de aprender e de

colocar em prática as diferentes técnicas manuais que são realizadas neste setor as quais irei desenvolver com maior pormenor ao longo deste relatório.

7.1. Exame macroscópico

O processamento das amostras em microbiologia é iniciado com o exame macroscópico, ou seja, na observação a olho nu das amostras de forma a documentar as suas características, como a cor, turvação, a consistência, a presença de sangue ou muco e o volume da amostra. É crucial que toda esta informação das amostras seja registada de forma a auxiliar o microbiologista a definir o processo a prosseguir até à obtenção de um diagnóstico final⁶.

7.2. Exame microscópico direto

Após a observação macroscópica realiza-se o exame microscópico direto, que consiste na observação ao microscópio ótico das amostras e é fundamental para determinar a qualidade da amostra, dar indicação do que pode estar alterado com o doente e permitir estudar a morfologia das bactérias que podem estar presentes, o que pode ser crucial para a seleção dos meios de cultura. Posteriormente, pode-se comparar o que cresceu em cultura e o que foi observado no exame microscópio direto⁶.

No laboratório de microbiologia do Avelab é realizado primeiramente o exame a fresco e posteriormente são realizadas técnicas de coloração que são fundamentais para a identificação e deteção de bactérias e fungos, como a coloração de Gram e a coloração de Ziehl-Nielson.

7.2.1. Exame a fresco

O exame a fresco consiste na observação microscópica da amostra, entre lâmina e lamela, sem a adição de nenhum reagente. Em algumas situações pode ser necessário adicionar uma gota de soro fisiológico, como é o caso de amostras em zaragatoas e fezes. No exame a fresco é observada a qualidade amostra, por contagem das células epiteliais, eritrócitos e leucócitos de forma a avaliar se há ou não infeção. No laboratório de microbiologia do Avelab é realizado o exame a fresco nas amostras de urina, fezes, exsudados uretrais, vaginais e de exsudados purulentos.

7.2.2. Coloração de Gram

A coloração de Gram é uma das técnicas de coloração mais usadas no laboratório de microbiologia, porque permite diferenciar bactérias com base nas características estruturais da parede celular em dois grupos: bactérias de Gram positivo e bactérias de Gram negativo. Além disso, permite caracterizar as bactérias quanto à sua morfologia em cocos, bacilos ou

cocobacilos. Nesta coloração utilizam-se dois corantes, o violeta genciana (corante primário) e a fucsina diluída ou safranina (corante secundário), um mordente (soluto de lugol) e um diferenciador ou descorante (álcool-acetona). Primeiro cobre-se o esfregaço com o violeta genciana que vai corar todas as bactérias de roxo. Posteriormente, rejeita-se o corante e cobre-se o esfregaço com o lugol que vai aumentar a afinidade do corante para as bactérias. Após a atuação do álcool-acetona, as bactérias que retêm o corante, permanecendo roxas, são bactérias de Gram positivo. Se após essa atuação ficarem descoradas, serão posteriormente coradas de rosa com adição da fucsina diluída ou safranina e são classificadas de bactérias de Gram negativo⁷. Para além da observação das bactérias também é possível observar leucócitos, células epiteliais e permite a deteção da maioria dos fungos⁷.

7.2.3. Coloração de Ziehl-Neelsen

A coloração de Ziehl-Neelsen é usada para identificar bactérias do género *Mycobacterium spp.*, nomeadamente a *Mycobacterium tuberculosis* que são caracterizadas por possuírem ácidos micólicos na parede celular o que as torna resistentes à descoloração com álcool-ácido. O esfregaço fixado é inicialmente exposto ao corante vermelho fucsina de Ziehl com auxílio do calor para aumentar a entrada e retenção do corante. Posteriormente, é usado um descorante, álcool-ácido, que remove o corante das bactérias que não contêm ácidos micólicos na parede celular e, por isso, ficam descoradas nesta fase. As bactérias álcool-ácido resistentes retêm o corante primário, apresentando cor vermelha. O restante material presente na amostra, células que não são álcool-ácido resistentes, ficam coradas de azul devido adição do corante secundário, azul de metileno⁷.

7.2.4. Método do hidróxido de potássio (KOH)

Este método consiste em adicionar KOH a 10% a uma amostra, como por exemplo cabelos, unhas e escamas da pele de forma a clarear a amostra, tornando mais fácil a observação de fungos ao microscópico⁸.

7.2.5. Coloração com azul de lactofenol

A coloração com azul de lactofenol é usada no exame direto de elementos fúngicos. Com esta coloração, os fungos coram de azul, sendo que as células das leveduras, os micélios e as estruturas de frutificação adquirem uma coloração azul delicada que permite uma melhor visualização dos fungos, enquanto o fundo apresenta um azul-pálido⁸.

7.3. Exame Cultural

O exame cultural é crucial para a caracterização e identificação definitiva de agentes patogênicos presentes em produtos biológicos. Consiste em semear a amostra em meios de cultura com o objetivo de isolar e permitir o crescimento de microrganismos, de determinar qual o agente patogênico causador da infecção e diferenciar de prováveis colonizadores ou contaminantes.

As bactérias para crescerem em meios de cultura necessitam de determinadas condições e por isso existem meios de enriquecimento, nutritivos, seletivos e diferenciais⁸. Os meios de enriquecimento contêm nutrientes específicos para o crescimento de uma ou mais bactérias patogênicas que possam estar presentes na amostra. O meio nutritivo (não seletivo) contém nutrientes que sustentam o crescimento da maioria dos microrganismos não fastidiosos sem dar a vantagem de crescimento a nenhuma bactéria específica. O meio seletivo contém um ou mais agentes que são inibitórios para a maioria das bactérias, exceto a que se pretende isolar e por isso este meio seleciona o crescimento de certas bactérias em detrimento de outras. O meio diferencial contém um ou mais compostos, como indicadores e açúcares que permitem o crescimento de colônias de uma determinada espécie e diferenciá-las visualmente devido a determinadas características metabólicas⁸.

A escolha do meio de cultura a ser utilizado depende do tipo de amostra e do exame microscópico, uma vez que este fornece informação sobre a morfologia e se são bactérias de Gram positivo ou de Gram negativo. Os meios usados no laboratório de microbiologia do Avelab encontram-se descritos na Tabela II.

Após a inoculação da amostra no meio de cultura apropriado é necessário fornecer as condições necessárias para que ocorra o crescimento de microrganismos clinicamente relevantes. As culturas para o desenvolvimento de bactérias potencialmente patogênicas são incubadas a uma temperatura de 37°C, que é a temperatura ótima de crescimento para a maioria das bactérias e durante 18 a 24 horas que é o tempo necessário para o seu crescimento. No entanto, existem bactérias que têm um crescimento mais lento e por isso o seu crescimento pode ser observado após 48 horas. A maior parte das bactérias são aeróbias facultativas e por isso crescem à atmosfera normal, mas existem algumas bactérias fastidiosas como a *Neisseria gonorrhoeae* e o *Streptococcus spp.* que necessitam de uma atmosfera com 5 a 10% de CO₂. Existe outra exceção que é em relação às espécies de *Campylobacter spp.* que necessitam de uma atmosfera microaerofílica para crescerem. Os fungos filamentosos têm um crescimento lento e por isso são incubados durante 21 a 30 dias a uma temperatura de 30°C⁸.

Tabela III Meios de cultura e a respetiva finalidade^{8,9}.

Meios de cultura	Finalidade
CHROMagar orientation	Meio cromogéneo para bactérias associadas a infeções urinárias. Permite a identificação direta de <i>Escherichia coli</i> , a identificação presuntiva de outras <i>Enterobacteriales</i> , a identificação de <i>Enterococcus</i> e da maioria das estirpes de <i>Staphylococcus saprophyticus</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> .
chromID Strepto B	Meio cromogéneo seletivo para deteção de <i>Streptococcus</i> do grupo B, mais especificamente <i>Streptococcus agalactiae</i> .
Gelose de chocolate + PolyViteX	Meio de enriquecimento não seletivo usado para a deteção de <i>Haemophilus spp.</i> e <i>Neisseria spp.</i>
Gelose de sangue	Meio diferencial não seletivo que permite o isolamento de microrganismos não fastidiosos e permite observação dos tipos de hemólise de <i>Streptococcus spp.</i> e <i>Staphylococcus spp.</i>
Chapman	Meio seletivo para <i>Staphylococcus spp.</i> e deteção de <i>S. aureus</i> .
chromID MRSA SMART	Meio cromogénico seletivo e diferencial para <i>S. aureus</i> resistentes à meticilina (MRSA)
Gelose Salmonella- Shigella (SS)	Meio seletivo para o isolamento de <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i>
Gelose Mac Conkey	Meio seletivo e diferencial para bacilos de Gram negativo. Diferencial porque permite a distinção entre bactérias fermentadoras de lactose das não fermentadoras.
Muller-Hinton	Meio usado para a realização do antibiograma pelo método de difusão em disco.
Löwenstein-Jensen	Meio usado para o isolamento de micobactérias.
Gelose de Sabouraud	Meio para o crescimento de fungos.
Candida select	Meio cromogéneo seletivo para o isolamento de leveduras permitindo a identificação direta de <i>Candida albicans</i> e a identificação presuntiva <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> e <i>C.krusei</i> .
Gelose Campyloset (CAM)	Meio seletivo para o isolamento de espécies <i>Campylobacter</i> .
Ágar Cetrimida (CET)	Meio seletivo para o isolamento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
Caldo selenito	Meio de enriquecimento seletivo para a pesquisa de <i>Salmonella spp.</i>
Caldo Todd-Hewitt	Meio de enriquecimento seletivo para a deteção de <i>S. agalactiae</i> .
Gelose Cistina-Lactose-Deficiente de Eletrólitos (CLED)	Meio diferencial que é usado para o isolamento de microrganismos envolvidos nas infeções urinárias. Evita a proliferação de espécies de <i>Proteus</i> . (devido à ausência de eletrólitos)
Gelose CHROMID CARBASMART (CARB/OXA)	Meios cromogéneos seletivos para o rastreio de <i>Enterobacteriales</i> produtoras de carbapenemases.

7.4. Provas de identificação

No laboratório Avelab as amostras são inoculadas e na manhã do dia seguinte são observadas todas as culturas. As placas com culturas negativas e as com desenvolvimento de colónias reduzido podem ser incubadas novamente, em algumas situações, de forma a confirmar a negatividade. Já as culturas positivas são analisadas, fazendo-se o registo de todas as características e é realizada, quando possível, a identificação presuntiva através da cor, aspeto e cheiro das colónias, entre outras características. Consoante o microrganismo de que se suspeita, são realizadas provas bioquímicas que permitem identificar o género e a espécie

da bactéria através das características metabólicas. Quando existem dúvidas pode ser necessário fazer um esfregaço com coloração de Gram. Na Tabela III encontram-se as provas bioquímicas que realizei manualmente ao longo do meu estágio.

Tabela III | Provas de identificação que se realizam no laboratório AVELAB⁸.

Prova	Finalidade
Catalase	Diferenciação de bactérias Gram positivas. Os estafilococos são catalase positiva enquanto os estreptococos e enterococos são catalase negativa.
Oxidase	Distinção de bactérias Gram negativas. <i>Pseudomonas spp.</i> é oxidase positiva.
Coagulase	Diferenciação de estafilococos, em que o <i>Staphylococcus aureus</i> é coagulase positiva e os outros <i>Staphylococcus spp.</i> são coagulase negativa.
Indol	Deteta as bactérias que tem a enzima triptofanase que degradam o triptofano produzindo indol.

Após a identificação presuntiva é realizada a identificação automatizada no aparelho VITEK Compact 2 de forma a confirmar ou a identificar diretamente, quando não é possível através da cultura e das provas de identificação clássicas. Existem cartas de identificação para as bactérias de Gram negativo e de Gram positivo que são usadas na maioria das situações, exceto quando amostras de urina são inoculadas no meio de cultura CHROMagar Orientation e crescem colónias características de *E. coli* (Figura 1) uma vez que este meio é cromogéneo e permite identificar esta bactéria através da morfologia e da cor das colónias.



Figura 1 | Meio CHROMagar orientation com colónias rosa características de *E.coli*.

7.5. Identificação e antibiograma

O VITEK Compact 2 para além da identificação também permite realizar o antibiograma. O antibiograma tem como objetivo avaliar a suscetibilidade das bactérias aos antibióticos. Este deve ser realizado sempre que ocorra infeção provada por um microrganismo e que seja necessária terapêutica antimicrobiana⁸. Desta forma, são realizadas suspensões bacterianas em solução salina com uma turvação segundo a escala de McFarland e são colocadas as cartas de identificação e de antibiograma. As cartas usadas são:

- GN Test: identificação de bacilos de Gram negativo
- GP Test: identificação de microrganismos de Gram positivo
- AST-N355: Antibiograma de Enterobacterales

- AST-N373: Antibiograma de *Pseudomonas spp.* e *Acinobacter spp.*
- AST-P648: Antibiograma de *Staphylococcus spp.*
- AST-P586: Antibiograma de *Enterococcus spp.* e *Streptococcus agalactiae*
- AST-ST03: Antibiograma de *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* β -hemolíticos e *Streptococcus viridans*



Figura 2| VITEK 2 Compact bioMérieux

As cartas são colocadas no aparelho e são preenchidas automaticamente por um sistema de vácuo e são seladas e armazenadas num carrossel onde são submetidas a uma medição de fluorescência a cada 15 minutos¹⁰. As cartas de identificação fazem a identificação com base em métodos bioquímicos estabelecidos que permitem medir a utilização da fonte de carbono, atividades enzimáticas e resistência das diferentes espécies bacterianas. Posteriormente, o sistema compara os resultados com a base de dados de forma a identificar o microrganismo fornecendo a informação da probabilidade dessa identificação estar correta ou não. Quando não consegue fazer a identificação, o sistema fornece uma lista de microrganismos possíveis de estarem presentes ou simplesmente notifica que não é possível identificar¹⁰. As cartas de antibiograma contêm antibióticos e o equipamento regista a CMI (concentração mínima inibitória) para cada antibiótico. De seguida, com base nas normas da Direção Geral de Saúde e com as recomendações da *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), os resultados são emitidos como bactéria resistente (R), sensível com elevada exposição (I) ou sensível (S) a determinado fármaco.

O sistema deteta crescimento bacteriano e alterações metabólicas nos micropoços das cartas através de uma tecnologia baseada em fluorescência e após terminar a leitura temos o resultado da identificação e do respetivo antibiograma¹⁰. O sistema VITEK também tem a capacidade de detetar padrões de resistência bacteriana e por isso deteta bactérias produtoras de β -lactamases de espectro alargado (ESBL).

7.6. Processamento de amostras

No laboratório de microbiologia do Avelab recebe uma grande variedade de produtos biológicos como urina, fezes, exsudados nasofaríngeos, exsudados vaginais e/ou uretrais, expetorações, exsudados purulentos, cabelos, unhas, raspados de pele entre outros. As amostras de urina são a amostra que surge mais frequentemente e por isso o exame bacteriológico de urina é o mais realizado no laboratório de microbiologia. As amostras são triadas no Apollo 3 e posteriormente são processadas. Assim, irei apresentar os

procedimentos que são realizados consoante o tipo de amostra e sempre que possível irei apresentar casos clínicos que tive em contacto ao longo do meu estágio.

7.6.1. Urina

A infeção do trato urinário (ITU) consiste numa infeção originada por um agente patogénico em qualquer parte do trato urinário, e, por isso, pode ocorrer nos rins, ureteres, bexiga e uretra. Assim, as infeções do trato urinário podem ser classificadas consoante o local de infeção. A infeção pode ocorrer no trato urinário superior, que é caracterizada pela infeção nos rins, denominando-se de pielonefrite. A infeção no trato urinário inferior é mais comum e consiste na infeção da bexiga que pode resultar em uretrite e cistite^{7,11,12,13}. As ITU são das infeções mais comuns na comunidade, afetando com mais frequência as mulheres devido à anatomia do trato urinário, têm a uretra mais curta do que os homens e a uretra encontra-se muito próxima da região perianal que é muito colonizada por microrganismos^{7,8}.

Geralmente, a urina e o trato urinário acima da uretra são estéreis, mas a uretra inferior apresente uma microbiota constituída por *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *S. epidirmis*. A urina ao passar por este local pode ficar contaminada deixando de ser estéril.⁴ Desta forma, é importante a interpretação da urocultura de forma a identificar se o microrganismo presente é colonizador, contaminante ou responsável por infeção.

Qualquer agente patogénico pode colonizar o trato urinário, desde fungos, parasitas e vírus, mas a causa mais comum é provocada por bactérias, nomeadamente por *E.coli* que é a causa mais frequente de ITU. Também podem ocorrer infeções provocadas por outros bacilos de Gram negativo, como é o caso de *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Proteus mirabilis* e de cocos de Gram-positivo, como *Enterococcus spp.* e *Staphylococcus spp.*¹². Para além das bactérias também pode ser observado o parasita *Trichomonas vaginalis*, e podem ocorrer infeções por *Candida spp.*, uma levedura do grupo dos fungos. A colonização por esta levedura é mais comum em situações de diabetes e em situações de obstrução do trato urinário^{7,8}.

Colheita

A colheita é um passo crucial para obtenção de um resultado fidedigno, pois uma má colheita pode levar a que ocorra contaminação e conseqüentemente a resultados dúbios. Nos adultos deve ser colhido o jato intermédio da primeira urina da manhã, se não for possível deve ser colhida urina após estar duas horas sem urinar. Antes da colheita deve-se lavar as mãos e lavar com água e sabão a região urogenital e de seguida enxaguar com água e secar, posteriormente deve ser colhido o jato intermédio para o frasco estéril. Nas crianças que usam fralda, a urina deve ser colhida para o saco estéril, tendo previamente lavado com água

e sabão toda a zona genital. O volume de urina mínimo que deve ser colhido é de 10 mL nos adultos e 5 mL nas crianças.

Urianálise

A urianálise permite a avaliar se estão presentes distúrbios a nível renal e a nível do trato urinário, sendo possível também avaliar outras alterações sistêmicas.

No laboratório Avelab, as urinas que têm análise de sumária de urina e exame bacteriológico são processadas nos aparelhos UNAMAX e sediMAX. A combinação destes dois aparelhos permite que a análise de urina seja totalmente automatizada e, desta forma, reduzir o erro humano e consequentemente melhorar o rendimento e aumentar a precisão analítica. A análise de sumária de urina tem início no equipamento UNAMAX, permitindo avaliar vários parâmetros como o ácido ascórbico, nitritos, microalbumina, leucócitos, creatinina, cetonas, urobilinogénio, bilirrubina, glicose, proteínas, pH, sangue, cálcio, albumina/creatinina, a densidade, a cor e turvação.



Figura 3|UNAMAX A.Menarini diagnostics.

Os métodos de leitura do equipamento os seguintes:

- Fotometria de refletância com 5 comprimentos de onda para os resultados das tiras teste;
- Método de refração para determinar a densidade;
- Método da difusão da luz para a avaliar a turvação da amostra;
- Medição da transmissão de luz para avaliar a cor.

Seguidamente, as amostras prosseguem para o sediMAX que é um analisador do sedimento urinário que utiliza a metodologia de microscopia digital de campo total através de um microscópio e de uma câmara digital incorporada com um *software* de processamento de imagem. Faz a captura de quinze imagens de diferentes campos, realiza uma análise morfológica e faz a contagem dos elementos presentes no sedimento. Posteriormente, o técnico realiza a validação dos resultados fornecidos pelo sistema. O equipamento sediMAX deteta eritrócitos, leucócitos, cilindros hialinos e patológicos, células epiteliais escamosas, células epiteliais renais e de transição, bactérias, leveduras, cristais de oxalato de cálcio monohidratado e dihidratado, cristais de ácido úrico e trifosfatos, muco, espermatozoides e material amorfo.



Figura 4|sediMAX A.Menarini

Exame a fresco, coloração de Gram e exame cultural

As urinas que têm análise de sumária de urina e exame bacteriológico são inicialmente processadas no sediMAX e avalia-se a possibilidade de haver infecção ou não. As urinas que apenas têm pedido para exame bacteriológico, são centrifugadas a 2000 rpm durante 10 minutos e posteriormente é observado o sedimento urinário ao microscópico ótico.

De seguida apresento um caso clínico como exemplo, salientando que os resultados apresentados são específicos da situação em causa.

Caso Clínico: Mulher com 85 anos com uma colheita de urina para exame bacteriológico. No exame microscópico do sedimento urinário (Figura 5) foram observadas algumas células epiteliais, 53 / μL leucócitos (referência $<15 / \mu\text{L}$) e não foram observados eritrócitos. Na coloração de Gram (Figura 6) é possível observar cocos de Gram positivo em cadeia. A amostra foi inoculada no meio *CHROMagar orientation*, com auxílio de uma ansa descartável de 10 μL .

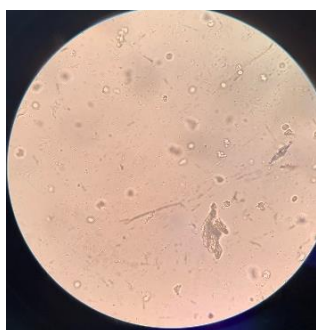


Figura 5| Observação microscópica do sedimento urinário: presença de algumas células epiteliais, leucócitos e bactérias (ampliação de 100x).

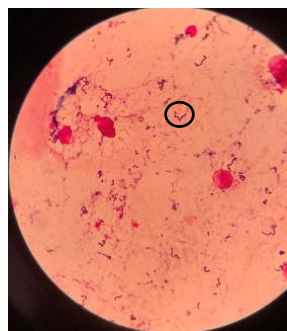


Figura 6| Coloração de Gram com observação de cocos Gram positivos em cadeia (círculo).

Interpretação dos resultados

Após o tempo de incubação, observou-se se houve ou não crescimento de bactérias e realizou-se a interpretação de acordo como fluxograma apresentado na Figura 7.

No exame cultural é possível observar que existe dimorfismo bacteriano, apresenta uma contagem de colónias azul-turquesa $>10^5$ UFC/mL e apresenta 2 colónias que se diferenciam da restante cultura, apresentando uma contagem de colónias $<10^3$ UFC/mL (Figura 8). Como estas colónias não apresentam características típicas de uma estirpe potencialmente patogénica, estas colónias foram consideradas como contaminantes. Através das características das colónias predominantes suspeitou-se de *Enterococcus spp.*, uma vez que estas bactérias são caracterizadas por apresentarem colónias azul-turquesa e por serem de pequeno tamanho.¹⁰ Além disso, este tipo de bactérias é muito comum em infeções do trato

urinário. Assim, procedeu-se à repicagem de uma colónia pura para gelose de sangue que foi novamente incubada a 37°C.

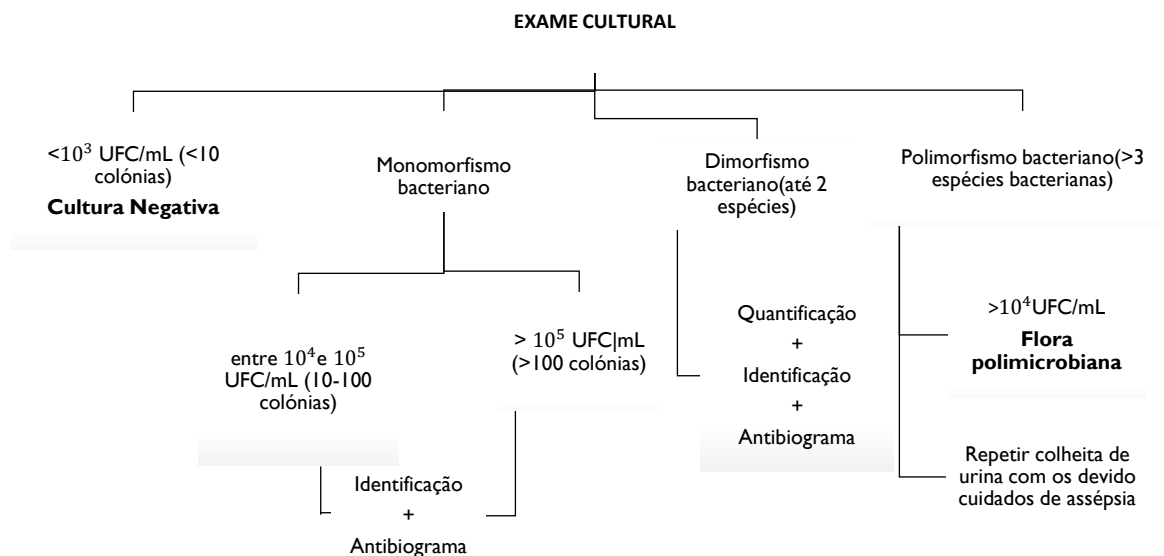


Figura 7 | Fluxograma de interpretação de urocultura^{5,6,7,8}

Após 18-24 horas, observou-se crescimento bacteriano, com colónias de pequena dimensão de cor acinzentada e sem hemólise. Posteriormente, realizou-se a identificação e o respetivo antibiograma no equipamento VITEK Compact 2, utilizando uma carta GP e uma carta de antibiograma AST-P586. O resultado da identificação foi o pressuposto inicialmente, *Enterococcus faecalis*.



Figura 8 | Colónias azul-turquesa no meio CHROMagar orientation com uma contagem de colónias >10⁵ UFC/mL.

7.6.2. Fezes

O intestino delgado superior é caracterizado por ter uma flora escassa, contendo essencialmente estreptococos, lactobacilos e leveduras, enquanto o íleo distal contém maioritariamente *Enterobacteriaceae* e *Bacteroides spp.* com uma contagem de 10⁵ a 10⁷ bactérias. No intestino grosso estão presentes maioritariamente bactérias anaeróbias.

As infeções do trato gastrointestinal são muito comuns na população, apresentando uma elevada taxa de mortalidade e morbidade nas crianças e nos idosos^{7,8}. A principal via de transmissão é através da via fecal-oral, como por exemplo através da ingestão de alimentos ou água potável contaminada com fezes^{7,8}. Os principais agentes patogénicos envolvidos podem ser bactérias, vírus ou parasitas:

- Bactérias: *E. coli*; *Shigella*; *Salmonella*; *Campylobacter jejuni*; *Vibrio cholerae* e *Clostridium difficile*.

- Vírus: Rotavírus e norovírus e adenovírus
- Parasitas: *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba*, *Cyclospora*.

Estes agentes patogénicos podem interagir com hospedeiro humano e provocar infeções através da produção de toxinas, da adesão ou invasão intracelular das células da mucosa⁸. Na maioria das situações as diarreias são auto-limitadas, mas existem situações em que é crucial o utente ter um diagnóstico e um tratamento^{7,8}.

Colheita

A colheita de fezes deve ser feita com auxílio de uma espátula de modo a colher uma amostra do tamanho de uma noz para dentro de um frasco estéril. No caso de ser solicitada mais que uma amostra, estas devem ser colhidas em dias diferentes. Para o exame parasitológico deve-se colher três amostras em dias alternados.

Exame bacteriológico e micológico

No laboratório Avelab o exame bacteriológico é orientado para a pesquisa de *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* e de *Campylobacter spp.*. No caso de o médico suspeitar de outro agente patogénico deve fazer uma prescrição em específico.

Exame direto e cultural

O primeiro passo que se realiza aquando da chegada de uma amostra de fezes é observar macroscopicamente o aspeto das fezes, nomeadamente a consistência, a cor e a presença de muco ou sangue. Posteriormente realiza-se o exame a fresco, observando-se ao microscópio a presença de leucócitos, eritrócitos e outros elementos celulares como parasitas. De seguida, realiza-se a coloração de Gram para avaliar a flora, de forma a verificar se existem alterações.

A amostra de fezes é inoculada no meio Campyloset, *Salmonella-Shigella (SS)*, MacConkey e no caldo selenito, que é um caldo de enriquecimento de *Salmonella*. Neste caso, no dia seguinte faz-se uma repicagem do caldo selenito para o meio SS. No caso de o médico ter prescrito o exame micológico a amostra é inoculada em meio Sabouraud. Os meios são incubados durante 18-24 horas, a 37°C, com exceção do meio Campyloset que é incubado em microaerofilia no mínimo durante 48 horas.

Interpretação dos resultados

Após a incubação, observa-se se ocorreu crescimento bacteriano nos meios inoculados.

No meio SS avalia-se se as colónias são características de *Salmonella*, ou seja, colónias incolores com centro negro, em que ocorre produção de H_2S , ou de *Shigella*, que apresenta

colónias incolores. No agar Campyloset observa-se se as colónias são sugestivas de *Campylobacter spp.* ou seja colónias pequenas e cinzentas. Para confirmar realiza-se o teste da oxidase (resultado positivo) e uma coloração de Gram onde se observam bacilos de Gram negativos espiralados.

Após a identificação presuntiva, realiza-se a identificação e/ou antibiograma no sistema VITEK 2 Compact. No laboratório Avelab é muito raro surgirem culturas positivas para estes agentes patogénicos e durante o meu estágio todos os casos que acompanhei deram negativo.

Testes imunocromatográficos por *lateral flow assay* nas fezes

No laboratório de microbiologia são realizados alguns testes imunocromatográficos por *lateral flow assay* para pesquisa de *Helicobacter pylori*, *Giardia lamblia*, adenovírus e rotavírus.

Helicobacter pylori é uma bactéria Gram negativa que é responsável por causar gastrites crónicas, predisõe o aparecimento de úlceras gástricas e aumenta o risco de desenvolver o adenocarcinoma no estômago^{7,8}. A infeção com este agente patogénico é muito comum na comunidade e a incidência aumenta com a idade⁷.

O rotavírus é o principal responsável por causar gastroenterites em bebés e crianças e tem uma elevada taxa de mortalidade nesta faixa etária. O adenovírus também pode estar envolvido neste tipo de doenças. O principal sintoma associado é diarreia profusa e aquosa⁶.

Giardia lamblia é um parasita responsável por provocar giardíase, que é uma doença diarreica. Algumas pessoas podem não apresentar sintomas e outras pessoas, principalmente crianças, idosos e pessoas com deficiência em IgA podem desenvolver diarreia crónica e má absorção resultando em consequências mais graves como desnutrição, anemia e desidratação e em alguns casos pode levar à morte^{7,8}.

Os testes imunocromatográficos por *lateral flow assay* são métodos não invasivos, são rápidos, precisos e fáceis de executar. O princípio do teste é igual para os diferentes agentes infecciosos e baseia-se na deteção do antigénio do agente infeccioso que se pretende pesquisar. Os kits comerciais contêm um tubo de diluição com uma espátula que deve ser inserida em três locais diferentes da amostra, posteriormente deve-se colocar a diluição na cassete e aguardar pelo resultado (os tempos de espera variam de teste para teste). Se o agente patogénico estiver presente, os antigénios presentes na amostra vão se ligar aos anticorpos do kit e surge uma linha colorida na linha teste (T). Adicionalmente deve aparecer uma banda na linha de controlo (C) que serve como verificação de que foi adicionado volume suficiente, se foi obtido fluxo adequado e como controle interno dos reagentes.

Parasitológico

O exame parasitológico das fezes é realizado através de um método da concentração de parasitas de forma a aumentar a possibilidade de detetar os parasitas presentes nas fezes. Utiliza-se o kit comercial MINI PARASEP que contém um tubo que tem um filtro que retém as partículas grandes. Coloca-se nesse tubo uma porção de amostra e esta é homogeneizada quando entra em contacto com o reagente contido no tubo. Posteriormente, centrifuga-se a 400 g durante 2 minutos e observa-se o sedimento ao microscópico ótico.

Durante o meu estágio, apenas tive em contacto com um caso que deu positivo. Nas fezes de uma criança de 11 anos foi observado o verme adulto do parasita *Enterobius vermicularis* (Figura 9). Os ovos característicos desta espécie foram observados dentro do verme (Figura 10). Macroscopicamente foi visível o verme no sedimento após concentração.

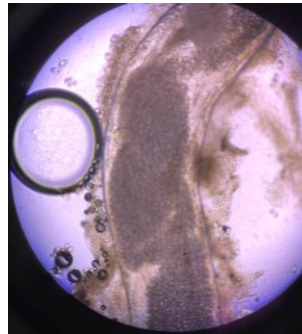


Figura 9| Observação microscópica do verme adulto de *Enterobius vermicularis* (ampliação de 100x).

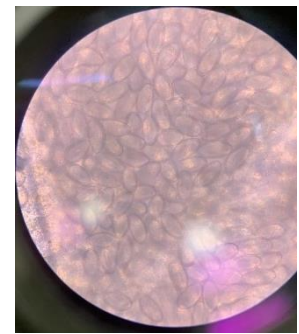


Figura 10| Observação microscópica de ovos de *Enterobius vermicularis* (ampliação de 400x).

7.6.3. Exsudatos retais, vaginais e uretrais

O trato genital pode ser infetado por bactérias, vírus, fungos e parasitas. As infeções nas mulheres podem ocorrer devido a alterações de pH e por terem o sistema imunológico comprometido que pode provocar uma alteração da flora vaginal e originar vaginoses bacterianas. Neste tipo de infeções ocorre uma diminuição de lactobacilos, que fazem parte da flora, o que leva a um aumento de pH permitindo que outros tipos de bactérias se instalem como é o caso de *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus spp.* e *Mycoplasma spp.*^{7,8}. Nestes casos não está comprovado que as infeções são transmitidas por contacto sexual, mas as relações sexuais desprotegidas aumentam o risco de contrair este tipo de infeções⁷. As mulheres grávidas também têm uma maior probabilidade de contrair vaginoses bacterianas. Também é muito comum ocorrerem infeções por *Candida albicans*, dando origem a candidíases, quando ocorre uma alteração na flora vaginal⁷.

A infeção pelo parasita *Trichomonas vaginalis* é muito frequente em mulheres e homens, sendo que existe uma elevada percentagem de infeções assintomáticas, geralmente nos homens, o que facilita a transmissão através do contacto sexual^{7,8}.

Os principais patógenos envolvidos em uretrites/cervicites são transmitidos normalmente por contacto sexual e são a *Neisseria gonorrhoea*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasmas urealyticum* e *Mycoplasma spp.*⁷.

As mulheres grávidas podem ser portadoras de *Streptococcus agalactiae* na vagina e na altura do parto podem transmitir ao bebé esta bactéria e causar uma infeção neonatal grave. Desta forma é realizado um rastreio a todas as mulheres grávidas entre as 35 e 37 semanas de gestação de forma a prevenir este tipo de infeções.

Colheita

A colheita do exsudado vaginal consiste em introduzir um espéculo e com o auxílio de uma zaragatoa colhe-se uma amostra das paredes vaginais.

A colheita do exsudado retal deve ser realizada com uma zaragatoa, a qual deve ser introduzida nas criptas retais evitando o contacto com o material fecal.

Nos homens, o exsudado uretral deve ser realizado antes da primeira micção ou uma hora após a última micção. Introduce-se uma zaragatoa no interior da uretra e através de um movimento de rotação efetua-se a colheita.

Para a pesquisa de *S. agalactiae* nas mulheres grávidas, realiza-se a colheita de um exsudado vagino-retal usando preferencialmente apenas uma zaragatoa para aumentar a probabilidade da deteção da bactéria em questão¹⁹. Inicialmente a zaragatoa é inserida na vagina, sem usar um espéculo a cerca de dois centímetros. De seguida, a mesma zaragatoa é introduzida cerca de um centímetro no esfíncter anal¹⁹.

Exame direto e cultural

No laboratório Avelab é realizado o exame bacteriológico, micológico e parasitológico (BMP) de exsudados vaginais e uretrais. O processamento da amostra é iniciado pela realização do exame cultural e de seguida é realizado o exame a fresco que consiste em pesquisar a presença de *Trichomonas vaginalis* e observar a presença de elementos celulares como células epiteliais e leucócitos. Posteriormente, é realizada a coloração de Gram. No caso de a amostra ser exsudado vaginal observa-se a flora presente de forma a avaliar se existe alguma alteração. A amostra é inoculada em gelose de chocolate com polyvitex e em meio Sabouraud. Se a amostra presente for um exsudado uretral observa-se se estão presentes diplococos de Gram negativo intracelulares que são sugestivos de *Neisseria gonorrhoeae*. A Figura 11 é referente a uma coloração de Gram de um exsudado uretral de um rapaz jovem de 20 anos, que tinha prescrição para BMP uretral. No exame a fresco foram observados numerosos leucócitos,

alguns eritrócitos e não foi observado nenhuma estrutura característica de *Trichomonas vaginalis*. Posteriormente, foi realizada a coloração de Gram (Figura 11), onde foram observados muitos diplococos de Gram negativo intra e extracelulares, o que indica que o utente está provavelmente infetado com *N. gonorrhoeae*. A amostra foi inoculada em gelose de chocolate com polyvitex e em meio Sabouraud.

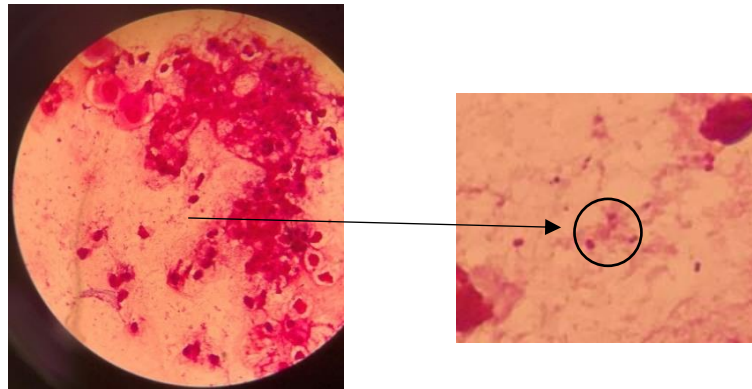


Figura 11 |Coloração de Gram do exsudato uretral onde são visíveis muitos diplococos Gram negativos intra e extracelulares sugestivos de *N.gonorrhoeae* (ampliação 100 x).

No rastreio de *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* do grupo B de Lancefiel) a amostra é um exsudado vagino-retal. Quando é rececionada no laboratório, a zaragatoa é inoculada no caldo Todd-Hewit, que é um meio de enriquecimento seletivo para a deteção de *S. agalactiae*. No dia seguinte repica-se do caldo seletivo para o meio chromID Strepto B.

Interpretação dos resultados

A observação do trofozoíto de *Trichomonas vaginalis*, protozoário flagelado muito móvel, no exame a fresco é o suficiente para se fazer o diagnóstico a tricomoníase.

Nos exsudados vaginais, a coloração de Gram auxilia na distinção de vaginoses bacterianas de outro tipo de infeções. Se for uma vaginose bacteriana é muito característico estarem presentes células epiteliais cobertas com bactérias com morfologia de cocobacilos de Gram variável, que são denominadas de “clue cells”. Também é muito comum os *Lactobacillus* não serem observados ou estarem presentes em menores quantidades e haver um predomínio de *Gardenerella vaginalis* e/ou *Mobiluncus spp.*. Também podem estar presentes outro tipo de bactérias como bacilos de Gram negativo e cocos de Gram positivo.

Quando se observam diplococos de Gram negativo na coloração de Gram e a amostra é proveniente de uma mulher, é necessário a confirmação com o exame cultural porque podem ser bactérias da normal flora vaginal. No caso de se observarem em amostras de homens, como no caso apresentado anteriormente (Figura 11), a observação do Gram indica que o utente tem gonorreia. Contudo, foi realizado o exame cultural de forma a confirmar. A bactéria *N. gonorrhoeae* tem um crescimento lento e por isso apresenta mais dificuldades em

crescer nas culturas. Na situação apresentada, após as 24 horas de incubação não foi observado crescimento bacteriano na gelose de chocolate com polyvitex e por isso prolongou-se a incubação até às 48 horas no qual já foi visível crescimento de colónias pequenas e brancas-acinzentadas que são sugestivas de *N. gonorrhoeae*. Normalmente nestas situações não é realizado o antibiograma porque o tratamento é empírico. Contudo, se o médico pedir o antibiograma, o laboratório Avelab encaminha a cultura para um laboratório externo porque não executa o antibiograma por microdiluição. O exame parasitológico e o exame micológico foram negativos uma vez que os exames diretos foram negativos e não se observou crescimento no meio Sabouraud.

Ainda no caso do jovem de 20 anos, o utente também tinha a prescrição de exame bacteriológico de urina, onde no exame a fresco (Figura 12) foram observadas raras células epiteliais, muitos leucócitos (>200/ μ L) e não foram observados eritrócitos. Na coloração de Gram (Figura 13) foi possível ver a alguns bacilos de Gram negativo que associado à presença de leucócitos sugerem uma infeção urinária. Assim inoculou-se a amostra em CHROMagar orientation, onde após 24 horas de incubação não se observou crescimento e por isso incubou-se até às 48 horas onde também não foi visível crescimento bacteriano. Este resultado sugere que a bacteriostase tenha sido provocada por antibioterapia, ou seja não ocorreu crescimento bacteriano porque o utente, eventualmente, se encontra a tratar a infeção com antibiótico. Esta consideração foi anotada no boletim.

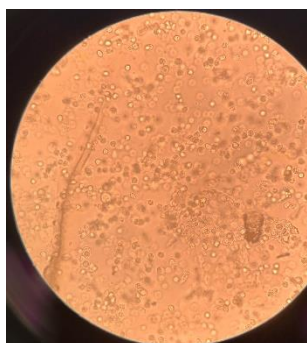


Figura 12| Observação microscópica do sedimento urinário com uma ampliação de 100x, onde são observadas raras células epiteliais e muitos leucócitos.

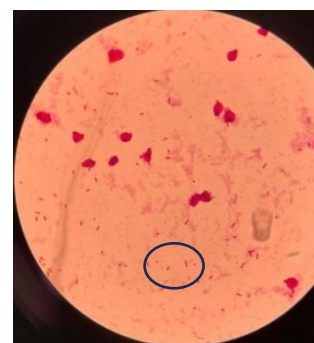


Figura 13| Observação microscópica da coloração de Gram com uma ampliação de 100x, onde são observados alguns bacilos de Gram negativo (círculo).

Na pesquisa de *Streptococcus agalactiae*, nas mulheres grávidas, após a repicagem para o meio chromID Strepto B e incubação, observa-se se estão presentes colónias rosa avermelhadas que são características da bactéria em pesquisa. Se nas 24 horas não forem observadas colónias com este aspeto, a placa fica incubada até as 48 horas e se após esse tempo de incubação não se observar colónias rosa avermelhadas o resultado é reportado como negativo. Na Figura 14 está um exemplo de um resultado negativo para a pesquisa de *S.agalactiae* e na Figura 15, pode-se observar um caso positivo para *S.agalactiae* em que são visíveis colónias avermelhadas.

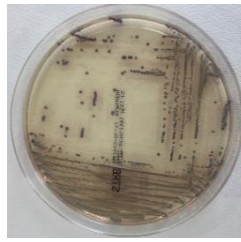


Figura 14| Colônias azuladas no meio chromID Strepto B indicam um resultado negativo para *S. agalactiae*.



Figura 15| Colônias avermelhadas no meio chromID Strepto B indicam um resultado positiva para *S. agalactiae*.

7.6.4. Exsudados de orofaringe e nasofaringe

A maioria das infecções do trato respiratório superior, como amigdalites e faringites são de origem viral, mas também existem bactérias que podem provocar infecção sendo a principal envolvida *Streptococcus* do grupo A de Lancefield, mais especificamente *Streptococcus pyogenes*⁶. O diagnóstico deste agente patogénico é importante porque é uma bactéria difícil de eliminar, podendo causar complicações como febre reumatoide e glomerulonefrite.⁶ A pesquisa é realizada através de exsudados da orofaringe⁷.

A colonização nasal por *S. aureus* é muito comum, mas este agente patogénico tem sido considerado uma preocupação para saúde pública devido à resistência que adquiriu aos antibióticos, nomeadamente à metilina^{15,16}. *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) em pessoas que apresentem o sistema imunitário comprometido pode provocar infecções graves e complicadas. Adicionalmente, uma pessoa portadora de MRSA pode transmitir para outras pessoas que estão em contato próximo na comunidade, como na família, lares e hospitais^{16,17}. No laboratório Avelab, a maioria das amostras para a pesquisa de MRSA é proveniente de utentes idosos que se encontram em lares e por isso o diagnóstico por parte do laboratório é fundamental para o tratamento e deteção precoce de MRSA. A pesquisa é realizada em exsudados nasais.

Colheita

Na colheita de exsudados da orofaringe deve-se deprimir a língua com ajuda de uma espátula e com uma zaragatoa, deve-se colher a amostra das amígdalas, pilares da faringe e de qualquer zona que apresente inflamação, ulceração e/ou exsudação purulenta evitando tocar na úvula, na língua ou noutra área da boca.

O exsudado nasal é colhido com uma zaragatoa que é inserida no orifício nasal até se sentir uma resistência e roda-se contras as paredes do orifício nasal e posteriormente coloca-se a zaragatoa em recipiente com meio de transporte.

Exame cultural

Nos exsudados nasais e da orofaringe não é realizado o exame direto uma vez que não apresenta relevância clínica. Desta forma, quando a amostra é rececionada no laboratório é inoculada diretamente nos meios de cultura.

Para a pesquisa de *Streptococcus* do grupo A de Lancefield, a amostra é inoculada em gelose de sangue e é incubada durante 48 horas numa atmosfera com 5-10% de CO₂ a 37°C. Para a pesquisa de MRSA a amostra é inoculada em meio chromID MRSA SMART e é incubada durante 18-24 horas a 37°C.

Interpretação dos resultados

Na gelose de sangue observa-se o desenvolvimento de colónias β-hemolíticas sugestivas de *Streptococcus* do grupo A. No meio MRSA o crescimento de colónias de cor malva é considerado como resultado positivo e o crescimento de colónias brancas é considerado como um resultado negativo.

Na Figura 16 são visíveis colónias com cor malva e com cor branca. Neste caso o resultado é reportado como positivo uma vez que basta o crescimento de uma colónia com cor malva para ser considerado positivo. Por vezes o aspeto das colónias pode levantar dúvidas e, nessas situações, realiza-se o teste da coagulase para o qual *S.aureus* é positivo. Em adição, também se pode realizar uma coloração de Gram para observar a presença de cocos de Gram positivo com agrupamento em cacho.

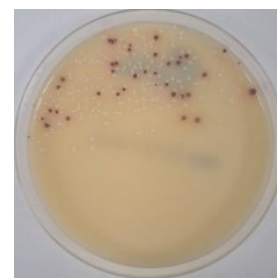


Figura 16| Colónias cor malva (+) e colónias com cor branca (-) em meio chromID MRSA. SMART.

Pesquisa de Antígeno Strep A nos exsudados da orofaringe

No laboratório Avelab também se realiza a pesquisa do antígeno de *Streptococcus* do grupo A (Strep A) através do teste imunocromatográfico por *lateral flow assay*. Este teste rápido permite a deteção qualitativa do antígeno do Strep A em amostras de orofaringe, dando o resultado em 5 minutos. O princípio deste teste é igual aos testes imunocromatográficos referidos anteriormente, a vantagem da utilização deste teste é que permite um resultado mais rápido, uma vez que o isolamento e identificação através dos métodos tradicionais demoram cerca de 24 a 48 horas. Desta forma, o médico pode iniciar a terapêutica mais rapidamente.

Caso Clínico: Uma mulher de 33 anos apresentava a prescrição para a pesquisa de antígeno Strep A e para a inoculação em placa. Realizou-se o teste imunocromatográfico por lateral flow assay e após cinco minutos obteve-se o resultado positivo (Figura 17) onde se observam duas bandas: uma banda na linha controlo e outra banda na linha teste. Para além do teste antígeno também pedia o isolamento e identificação pelos métodos tradicionais e por isso a amostra foi inoculada em gelose de sangue. Tendo em conta o resultado de antígeno já seria de esperar que ocorresse crescimento bacteriano de *S. pyogenes*. De facto, após a incubação da placa, observou-se o crescimento de colónias com β -hemólise que são sugestivas de *Streptococcus* do grupo A, (Figura 18). Desta forma, inoculou-se uma colónia para outra placa (Figura 19) e no dia seguinte realizou-se a respetiva identificação com a carta GP e o antibiograma com a carta AST-ST03 no VITEK Compact 2: A espécie *Streptococcus pyogenes* foi identificada e o antibiograma revelou que a estirpe era sensível para todos os antibióticos testados: amoxicilina, penicilina, azitromicina, eritromicina e clindamicina.



Figura 17| Teste positivo para a pesquisa do antígeno Strep A.

A pesquisa de antígeno por Strep A permite que a terapêutica seja administrada mais cedo uma vez que o resultado da técnica tradicional só foi lançado após 48 horas.

Nesta situação, a identificação e o isolamento confirmaram o resultado do teste rápido e permitiu obter o antibiograma. A estirpe



Figura 18| Colónias com β -hemólise em gelose de sangue.



Figura 19| Repicagem de uma das colónias da placa anterior.

apresentou sensibilidade para todos os antibióticos, mas se a bactéria identificada fosse resistente ao antibiótico prescrito o médico faria uma alteração da medicação.

7.6.5. Expetoração

As infeções do sistema respiratório inferior têm uma menor prevalência que as do sistema respiratório superior uma vez que a infeção não está só dependente da patogenicidade do microrganismo, mas também da capacidade de o hospedeiro prevenir a infeção.⁶ O organismo para além de apresentar mecanismos de defesa que protegem o trato respiratório possui a flora da nasofaringe e da orofaringe que previnem a colonização de outros microrganismos.^{6,7}

Em algumas situações, as bactérias que fazem parte da flora podem ser a causa de infeção por exemplo quando existe dano provocado por uma infeção viral, quando a pessoa apresenta o sistema imunitário comprometido ou por ocorrer dano físico no epitélio

respiratório.⁴ Nestes casos, os principais agentes patogénicos envolvidos são *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma spp.*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, Enterobacteriaceae, *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis* entre outros^{7,8}.

Além disso, existem microrganismos que quando presentes são considerados agentes patogénicos da doença como é o caso de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Legionella spp.*^{7,8}.

No laboratório Avelab quando uma amostra de expetoração é rececionada e consoante as análises solicitadas, realiza-se o exame direto e cultural para o diagnóstico e identificação do agente etiológico da infeção do trato respiratório inferior e realiza-se o exame direto e cultural para a pesquisa de micobactérias, mais precisamente para a deteção de *Mycobacterium tuberculosis*.

Colheita

A colheita da expetoração deve ser bem realizada para que não ocorra contaminação da amostra com secreções do trato respiratório superior, nomeadamente com saliva e com a flora do trato respiratório superior. Desta forma, pede-se ao utente para bochechar a boca com água e para desencadear golpes de tosse profunda para que sejam colhidas apenas secreções respiratórias, para um frasco estéril.

Exame direto, cultural e interpretação dos resultados

Com auxílio de uma ansa ou pipeta estéril seleciona-se uma porção da amostra que seja mais purulenta e coloca-se no centro de uma lâmina, realizando-se o esfregaço o mais fino possível e uniforme. Posteriormente realiza-se a coloração de Gram e observa-se ao microscópico avaliando-se a qualidade da amostra através da presença de células epiteliais e leucócitos. É considerada uma amostra com má qualidade se forem observadas mais de 10 células epiteliais por campo e menos de 25 leucócitos polimorfonucleares por campo. Uma amostra com boa qualidade apresenta menos de 10 células epiteliais por campo e mais de 25 leucócitos polimorfonucleares. Neste exame também se avalia se existe monoformismo bacteriano.

O exame cultural depende do que é observado na coloração Gram. Se forem observados cocos de Gram positivo, bacilos ou cocobacilos de Gram negativo, as amostras são inoculadas em gelose de sangue, gelose de chocolate e no meio MacConkey. Se tiver prescrição médica para exame micológico ou se forem observadas estruturas leveduriformes, as amostras são inoculadas em meio Sabouraud. Os meios são incubados nas condições apropriadas e

posteriormente avalia-se se ocorreu crescimento microbiano. Posteriormente é realizado a identificação e o antibiograma As bactérias que são valorizadas são *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, Enterobacteriaceae, *Pseudomonas spp.*, *Candida spp.* e *Aspergillus spp.*.

No exame direto para a pesquisa de micobactérias, realiza-se a coloração de Ziehl-Neelsen e observa-se ao microscópico se estão presentes bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), bacilos corados de vermelho. Para reportar como um resultado negativo deve-se observar pelo menos 100 campos. Se forem observados bacilos corados de vermelho, estes devem ser semiquantificados (Tabela IV) de forma avaliar o grau de excreção de BAAR e assim avaliar o grau de infecciosidade do utente. Quando são observados é imediatamente reportado ao médico para iniciar a terapêutica.

Tabela IV | Interpretação do resultado

Resultado	BAAR/Campo
Não foram observados BAAR	Não se observaram BAAR
Raros	1-2 BAAR/campo
Alguns	1-9 BAAR/100 campos
Frequentes	1-9 BAAR/10 campos
Muitos	1-9 BAAR/campo
Numerosos	>10 BAAR/ campo

O exame cultural consiste em inocular a amostra, após a descontaminação, fluidificação e concentração, em meio Löwenstein durante 6 semanas a 37°C. O crescimento das colónias deve ser verificar semanalmente. Após as 6 semanas de incubação, o exame é reportado como negativo se não forem observadas colónias e é considerado como positivo se ocorrer o desenvolvimento de colónias características de *Mycobacterium spp.*. A identificação e o antibiograma destas colónias suspeitas são realizados no Hospital de Aveiro para onde são enviadas as culturas.

Durante o meu estágio tive oportunidade de realizar estes procedimentos, mas os casos que analisei foram todos negativos.

7.6.6. Exsudatos purulentos: feridas e tecidos moles

Na comunidade é muito comum uma pessoa apresentar feridas que provocam a rutura da pele ou da membrana mucosa. A presença da ferida torna-se uma porta de entrada para microrganismos que podem ser provenientes do meio ambiente ou do objeto que provocou

a lesão^{7,8}. O desenvolvimento de infecção depende do sistema imunológico da pessoa, da virulência do microrganismo e do tipo de ferimento⁷.

Uma ferida limpa geralmente cicatriza sem necessitar de tratamento apesar de ocorrer colonização microbiana. Contudo, existem situações em que a presença de uma pequena ferida pode resultar em infecções graves, como cicatrização retardada, formação de abscessos e disseminação das bactérias ou das suas toxinas para outras áreas do corpo que pode até levar à morte⁷. Desta forma, em algumas situações a detecção e identificação do agente patogénico é fundamental para a atuação do clínico.

Os principais agentes etiológicos envolvidos neste tipo de infecções são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*, *Candida spp.* e *Pasteurella multocida*^{7,8}.

Colheita

Quando é realizada a colheita deve-se anotar qual o local da colheita e referir o tipo de lesão que está presente. Nas feridas superficiais deve-se lavar a superfície da ferida com soro fisiológico estéril de forma a remover os tecidos necrosados ou desvitalizados e com uma zaragatoa deve-se colher um exsudado das zonas profundas da lesão que apresentem inflamação ou infecção ativa. Posteriormente, a amostra é colocada num recipiente com meio de transporte adequado e é enviada para o laboratório.

Exame direto e cultural

Quando a amostra é rececionada no laboratório deve-se realizar o exame a fresco e regista-se a presença de leucócitos e eritrócitos. Posteriormente, realiza-se a coloração de Gram para detetar a presença de microrganismos e se tiverem presentes deve-se semiquantificá-los como raros, alguns, muitos ou numerosos

O exame cultural consiste em inocular a amostra em gelose de sangue, meio CLED, meio manitol-salgado e meio MacConkey, e incubar nas condições apropriadas.

Interpretação dos resultados

Após o período de incubação, observa-se se ocorreu crescimento bacteriano e o resultado é reportado como negativo se não houver desenvolvimento de bactérias patogénicas e é reportado como positivo se estiverem presentes bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e outros agentes patogénicos potencialmente patogénicos.^{6,7} Quando estão presentes mais de três espécies bacterianas, não se deve

valorizar clinicamente, nomeadamente de locais em possa ocorrer contaminação com a flora intestinal (como abscessos abdominais, abscessos e fistulas perianais e de úlceras de decúbito).

Caso Clínico: foi realizada a colheita de uma úlcera da região sagrada numa mulher de 83 anos que apresentava a prescrição para exame microbiológico. No exame a fresco observaram-se raros leucócitos e muitos eritrócitos. Posteriormente, foi realizada a coloração de Gram onde foram observados raros bacilos de Gram negativo e raros cocos de Gram positivo. Inoculou-se a amostra em CHROMagar orientation, MacConkey, Chapman CLED e gelose de sangue. Após o período de incubação observou-se o crescimento bacteriano nos meios inoculados (Figuras 20-24).



Figura 20| Colónias em meio CHROMagar orientation, apresenta colónias de *P.aeruginosa*.

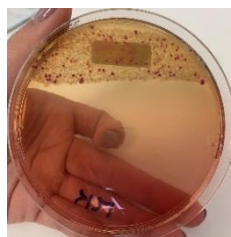


Figura 21| Colónias em meio Macconkey.



Figura 22| Colónias com cor amarela em meio Manitol-salgado, sugestivas de *S.aureus*.

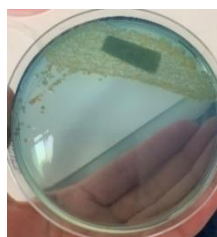


Figura 23| Colónias em meio CLED.

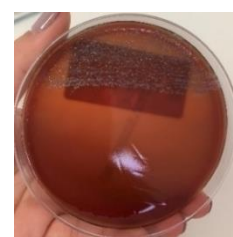


Figura 24| Colónias em gelose de sangue.

Através da análise dos meios, verificou-se que ocorreu crescimento de colónias características de *P. aeruginosa* no meio CHROMagar orientation do qual se repicou uma colónia para o meio seletivo para esta bactéria, o meio CET. Após o tempo de incubação foi visível o crescimento (Figura 25) e por isso repicou-se novamente uma colónia para o meio CHROMagar orientation para posterior realização do antibiograma.

No meio de Chapman foi visível o crescimento de colónias com cor amarela o que indica a presença de *S. aureus* e por isso repicou-se uma colónia para gelose de sangue e após o tempo de incubação observou-se o crescimento de colónias com β -hemólise (Figura 26). Realizou-se o teste da coagulase para a identificação presuntiva de *S. aureus* o qual deu um resultado positivo. Tendo em atenção os



Figura 25| Colónias de *P.aeruginosa* em meio CET.



Figura 26| Colónias com β -hemólise em gelose de sangue, sugestivas de *S. aureus*.

resultados das culturas, procedeu-se à realização do antibiograma de *P.aeruginosa* utilizando a carta AST-N373 e à identificação e antibiograma de *S. aureus* com as cartas GP e AST-P648, respetivamente. O sistema VITEK Compact 2 confirmou a suspeita de infecção por *S. aureus*. Desta forma a utente apresentava infecção de *P. aeruginosa* e *S. aureus* na úlcera da região sagrada.

7.6.7. Exame micológico em unhas, cabelos e pele

As unhas, o cabelo e a pele, por serem estruturas queratinizadas, podem ser infectados por fungos responsáveis por micoses superficiais e micoses cutâneas, dependendo da camada de tecido que é afetada. Estes tipos de infecções geralmente são provocados por dermatófitos e leveduras^{5,7,8}. As leveduras, nomeadamente da espécie *Candida spp.*, estão envolvidas maioritariamente em micoses superficiais, podendo também estar envolvidas em micoses cutâneas^{5,7}.

As micoses cutâneas são provocadas na maioria dos casos por dermatófitos, sendo os principais géneros envolvidos o *Tricophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum* que têm a capacidade de invadir a camada superior mais externa da epiderme e quebrar as superfícies de queratina da pele, unhas e cabelo e desta forma provocar infeção^{5,8}. Existem várias formas de dermatofitose e estas são denominadas comumente por tinhas ou micoses⁷.

Colheita

A colheita do cabelo consiste em arrancar, com auxílio de uma pinça os cabelos lesionados na periferia das áreas afetadas do couro cabeludo. As amostras de pele são obtidas por raspagem da periferia das lesões cutâneas, com ajuda de um bisturi. Por último, antes da realização da colheita de unhas deve-se higienizar com água e sabão e posteriormente deve-se raspar, com um bisturi, as áreas mais profundas e purulentas da unha. As amostras são colocadas numa placa de Petri sendo devidamente seladas e identificadas. De notar que antes das colheitas das amostras de pele e de unhas deve-se desinfetar com álcool a 100%.

Exame direto e cultural

Quando a amostra é rececionada no laboratório de microbiologia é preparado o exame microscópico direto com KOH a 10%. Para tal, coloca-se a amostra num tubo com KOH a 10% e é observada ao microscópio para a pesquisa de elementos fúngicos, nomeadamente de hifas e arthroconídeos que são características dos dermatófitos.

O exame cultural consiste em inocular amostra em duas placas de meio Sabouraud, colocando a amostra em três pontos separados, com uma distância de 2 a 3 cm para o desenvolvimento de colónias isoladas. As placas são colocadas em sacos transparentes e são incubadas a 30°C durante cerca de 4 semanas sendo que se deve acompanhar semanalmente a presença de desenvolvimento fúngico.

Interpretação do resultado

O exame microscópico direto tem como objetivo detetar, de uma forma mais rápida, elementos fúngicos, uma vez os resultados das culturas podem demorar dias ou até semanas. No entanto, podem ocorrer resultados falsos-negativos e falsos-positivos, e por isso a microscopia é menos sensível que o exame cultural. De notar que um exame microscópico direto negativo não descarta a presença de uma infeção fúngica⁷.

Após o tempo de incubação ou ao longo das semanas de incubação se for visível desenvolvimento fúngico procede-se à identificação que consiste em caracterizar a morfologia das colónias e fazer preparações a fresco com azul lactofenol, recorrendo por exemplo à técnica da fita cola, para observação microscópica, de estruturas fúngicas.

Ao longo do meu estágio tive oportunidade de realizar alguns exames micológicos, sendo que na maioria dos casos não havia infeção, com a exceção de um caso que passo a apresentar.

Caso Clínico: um senhor tinha a prescrição para exame micológico de unhas. A amostra de unha foi rececionada no laboratório e foi realizado o exame microscópico direto com KOH a 10% que deu positivo, pois foram observadas hifas. Realizou-se o exame cultural para confirmação e identificação do fungo. Após cerca de 2 semanas e meia de incubação no meio Sabouraud, observou-se desenvolvimento de colónias fúngicas que apresentavam uma cor branca e com textura algodoadosa no verso e cor amarela que evoluía para o centro com uma cor vermelha no reverso. Realizou-se uma preparação com azul de lactofenol recorrendo à técnica da fita cola em que foram observadas hifas e macroconídeos, característicos do fungo de *Trichophyton rubrum*. (Nesta situação não tive oportunidade tirar foto para o registo).

7.7. Serologia infecciosa

7.7.1. VDRL e TPHA

A sífilis é uma doença sexualmente transmissível muito comum a nível mundial e é causada por *Treponema pallidum*. A via mais comum de transmissão é através do contacto sexual direto, sendo que também pode ser adquirida por via congénita ou por transfusão sanguínea. O diagnóstico da sífilis é maioritariamente realizado com base em testes serológicos. Existem dois tipos de testes, os testes não treponémicos, que são inespecíficos, e os testes treponémicos, que são específicos. Os testes não treponémicos são usados primeiramente e se ocorrer reatividade positiva é confirmada através dos testes treponémicos⁷.

Os testes não treponémicos detetam a presença de anticorpos, imunoglobulina (Ig) G e IgM (reaginas), que são desenvolvidos contra as cardiolipinas libertadas pelas células danificadas por *Treponema pallidum*. No laboratório Avelab, realiza-se o teste *Veneral Disease Research*

Laboratory (VDRL) que é um teste semi-quantitativo e de aglutinação. Utiliza-se como reagente, partículas de carvão revestidas de cardiolipina que entra em contacto com o soro do doente e se este tiver reaginas vai ocorrer aglutinação, que é visível ao microscópico. Na Figura 27 encontra-se representado um resultado de VDRL positivo. O VDRL é um teste semiquantitativo porque permite semiquantificar os anticorpos presentes, uma vez que são realizadas sucessivas diluições do soro que entram em contacto com o reagente.

Os testes treponémicos são específicos porque detetam a presença de anticorpos específicos de *T. pallidum*. O teste que se realiza é o *Treponema pallidum Hemagglutination Assay* (TPHA) que consiste em usar eritrócitos revestidos com antígenos de *T. pallidum* que quando em contacto com o soro doente, que contenha anticorpos anti-*Treponema pallidum*, aglutinam.

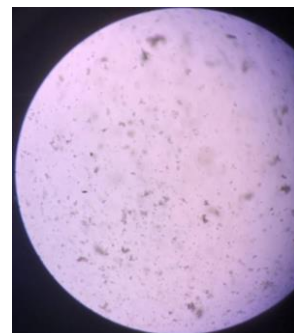


Figura 27|Teste VDRL positivo.

8. Hematologia

A hematologia é o ramo da ciência que estuda o sangue, nomeadamente os seus constituintes avaliando a sua concentração, estrutura e função. Também engloba a análise da sua produção e o estudo dos órgãos hematopoiéticos, principalmente a medula óssea que é responsável pela produção de eritrócitos, leucócitos e plaquetas^{19,20}.

O sangue desempenha um papel fundamental, uma vez que é responsável pelo transporte e distribuição de oxigénio e nutrientes pelo organismo, pela regulação do pH e da temperatura corporal e pelo combate às infeções²¹. O sangue é constituído por uma matriz líquida, o plasma que representa cerca de 55% do volume total e é constituído essencialmente por água que contem substâncias dissolvidas como globulinas, proteínas, iões, entre outros. O restante volume é constituído pelos elementos celulares, representando uma percentagem de 45%, e é constituído pelos glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e pelas plaquetas²¹.

A hematopoiese é processo que leva à produção das células sanguíneas, e ocorre maioritariamente na medula óssea na infância e na idade adulta. Durante a gestação o processo de hematopoiese, numa fase inicial ocorre no saco vitelino e a partir das 6 semanas até seis a sete meses de vida fetal os principais órgãos hematopoiéticos são o fígado e o baço que produzem células sanguíneas até cerca de duas semanas após o nascimento²¹.

As células sanguíneas formam-se a partir de uma célula pluripotente da medula óssea na qual ocorrem os processos de eritropoiese, mielopoiese, megacariopoiese, linfopoiese e a formação de monócitos que podem se diferenciar em macrófagos. Estes processos da

hematopoiese apresentam vários precursores até à célula final. As células sanguíneas que se formam a partir destes processos são: os eritrócitos, que tem a função de transporte dos gases dos pulmões para os tecidos e vice-versa; as plaquetas que estão envolvidas na hemóstase; os glóbulos brancos que podem ser neutrófilos, basófilos, eosinófilos e monócitos que protegem contra infeções bacterianas e os linfócitos, onde as células B são responsáveis pela produção de anticorpos e as células T auxiliam na resposta imune e conferem proteção contra vírus e outras células estranhas²¹.

Desta forma, o estudo das células sanguíneas é crucial para a deteção e o diagnóstico de patologias hematológicas, uma vez que, a maioria das alterações que ocorrem a nível das células sanguíneas devem-se a alterações que podem ocorrer ao longo do processo da hematopoiese ^{19,21}.

8.1. Testes Laboratoriais

No laboratório hematologia são rececionadas amostras de sangue colhidas em tudo de EDTA que atua como anticoagulante, ligando os iões de cálcio e interrompendo a cascata da coagulação sendo realizada a análise no sangue total. Também é usado o tubo de citrato de sódio que atua como anticoagulante e usado para preservar os fatores de coagulação permitindo o estudo da cascata de coagulação, o estudo é realizado no plasma. As análises que se realizam no laboratório de hematologia são: o hemograma, a velocidade de sedimentação (VS), hemoglobina glicada (HbA1C), provas da coagulação, teste de Coombs indireto e direto e determinação do grupo sanguíneo.

8.1.1. Hemograma

O hemograma é análise que permite o estudo das células sanguíneas e permite a deteção de alterações nas células que podem levar a patologias como a anemia e leucemias²¹. Esta análise juntamente com outros dados clínicos ajuda o clínico a tirar conclusões diagnósticas¹⁹. Desta forma o hemograma é dos exames mais requisitados e executados no laboratório de hematologia. O hemograma consiste em realizar a contagem dos constituintes do sangue, realizando uma análise dos eritrócitos, dos leucócitos e das plaquetas¹⁹.

No laboratório de hematologia do Avelab, o hemograma é realizado no aparelho automático Sysmex XN-2000 que é uma combinação de dois analisadores que permite o processamento de até 200 amostras por hora e para além disso gere o fluxo de trabalho de forma automática pelos dois analisadores e é capaz de reanalisar automaticamente as amostras que são consideradas patológicas^{26,27}. O Sysmex XN-2000 apresenta 5 canais distintos:

- **Canal WNR (XN-CBC-NRBC):** identifica e quantifica os eritroblastos e os leucócitos através de citometria de fluxo fluorescente^{26,27}.
- **Canal WDF (XN-DIFF-IG):** realiza a contagem automática de granulócitos imaturos (IG). Permite a discriminação entre monócitos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos atípicos e blastos através da citometria de fluxo fluorescente^{26,27}.
- **Canal de plaquetas fluorescentes (PLT-F):** a contagem de plaquetas é realizada através da impedância, mas quando a contagem não é precisa o aparelho marca esse parâmetro e realiza automaticamente a contagem através de um canal de fluorescência que identifica e quantifica as plaquetas. Além disso também é possível analisar graus de imaturidade das plaquetas e por isso permite avaliar a trombopoiese, quando são analisadas em conjunto com outros dados clínicos disponíveis^{26,27}.
- **Canal dos reticulócitos (RET):** fornece uma avaliação completa da eritropoiese, permitindo a classificação e diferenciação das células da série vermelha pelo seu tamanho e estado de maturação celular. Avalia, também, a produção de reticulócitos e avalia a incorporação de ferro na hemoglobina^{26,27}.
- **Canal para análise de outros líquidos biológicos (XN-BF):** através da citometria de fluxo fluorescente realiza a análise diferencial de outros líquidos biológicos.

Desta forma a partir deste aparelho automático é possível obter os seguintes parâmetros:

- **Contagem de células:** Contagem de eritrócitos, de plaquetas (PLT), reticulócitos (RET) e contagem e diferenciação das células brancas¹⁹.
- **Hemoglobina (HGB):** é uma proteína presente nos eritrócitos que é responsável pela realização das trocas de gases, de O₂ e C₂O, entre os tecidos e os pulmões. Este parâmetro permite detectar a presença de anemia, quando o valor se encontra abaixo dos valores de referência para a idade e sexo^{19,21}. A quantificação é realizada pelo aparelho automático através do método de sulfato de lauril de sódio (SLS), livre de cianeto^{26,27}.
- **Hematócrito (HCT):** é a percentagem de eritrócitos no sangue após a centrifugação. Pode ser expressa em percentagem (%) ou em litro/litro (l/l). O equipamento calcula este parâmetro através da contagem de eritrócitos e do volume corpuscular médio (VCM)¹⁹.
- **Volume corpuscular médio (VCM):** corresponde ao volume médio dos eritrócitos e é expresso em fentolitros (fl). Este parâmetro é útil para a classificação

das anemias, permitindo classificá-las em anemias microcíticas, normocíticas e macrocíticas¹⁹.

- **Hemoglobina corpuscular média (HCM):** representa a quantidade média de hemoglobina presente em cada eritrócito. É expressa em picogramas (pg)¹⁹.
- **Concentração da Hemoglobina globular média (CHGM):** corresponde à concentração média de hemoglobina num determinado volume de eritrócitos. É expressa em g/dL ou g/L. Este parâmetro permite classificar as anemias como hipocrômicas ou hiperocrômicas¹⁹.
- **Distribuição do volume eritrocitário (RDW):** é um índice de anisocitose eritrocitária, ou seja, fornece informação acerca da variação do tamanho dos eritrócitos. É expresso em percentagem (%)¹⁹.

8.1.2. Velocidade de sedimentação (VS)

A velocidade de sedimentação (VS) é uma análise usada para monitorizar e detetar processos inflamatórios que podem surgir devido à presença de patologias como doenças autoimunes, doenças malignas e infeções^{19,21}. A VS é influenciada pela proporção de glóbulos vermelhos para com o plasma, ou seja pelo hematócrito e é influenciada pela formação de rouleaux dos glóbulos vermelhos, em que sedimentam mais rapidamente do que as células isoladas. É influenciada pelo aumento da produção de proteínas da fase aguda, presente em algumas patologias como artrite reumatóide, a tuberculose e mieloma múltiplo e por alterações nas proteínas plasmáticas que podem surgir em infeções agudas ou crónicas e em doenças neoplásicas e degenerativas. Também é influenciada pela idade, ciclo menstrual e pela toma de medicamentos¹⁹. De salientar que a análise da VS é inespecífica, ou seja, são necessárias outras análises para suportar no diagnóstico e monitorização processos inflamatórios^{19,21}.

No laboratório Avelab esta análise é realizada no aparelho automático VES-MATIC CUBE 30 (Figura 28) que permite medir a sedimentação dos eritrócitos em tubos de EDTA através de um método padronizado baseado no método de Westergren, que consiste em medir a distância, em milímetros, dos eritrócitos que ficam no fundo dos tubos por ação da gravidade²⁰. Permite a análise de 30 amostras em simultâneo e a obtenção dos resultados após 34 minutos, através de leitura ótica^{19,21}.



Figura 28| VES-MATIC CUBE 30

8.1.3. Esfregaço do sangue periférico

O esfregaço do sangue periférico é realizado quando o utente tem prescrição médica, quando o equipamento Sysmex XN-2000 emite alertas ou quando na análise dos resultados se verificam alterações em alguns parâmetros, como por exemplo uma diminuição do número de plaquetas. Neste caso pode-se verificar se estão presentes agregados plaquetários que são indicativos de má colheita. Também se realiza o esfregaço sanguíneo quando existem valores de HGB baixos, valores de MCV e MHC aumentados ou diminuídos e quando há alteração no número de leucócitos e nos seus precursores.

Na observação do esfregaço do sangue periférico ao microscópico quantificam-se as células, avalia-se a morfologia das células, a presença de precursores de leucócitos, a presença de reticulócitos e observa-se se estão presentes parasitas como por exemplo, *Plasmodium spp*¹⁹.

O esfregaço no laboratório AVEALB é realizado manualmente e consiste em colocar uma gota de sangue numa lâmina e com ajuda de outra lâmina realiza-se um deslize contínuo de forma obter uma fina película de sangue para não ocorrer sobreposição das células, posteriormente deixa-se a secar e realiza-se a coloração de Leishman.

8.1.3.1. Coloração de Leishman

A coloração de Leishman consiste em colocar sobre o esfregaço, o corante de Leishman diluído a 1,8% em metanol durante 2 minutos. Posteriormente, adiciona-se água destilada e aguarda-se 7 minutos. Por fim, realiza-se a lavagem com água corrente e limpa-se a parte de trás da lâmina e coloca-se na vertical na estufa de forma a secar ¹⁹. Na figura 29 observa-se um esfregaço de sangue periférico com a coloração de Leishman e onde é possível observar no centro um neutrófilo hipersegmentado.

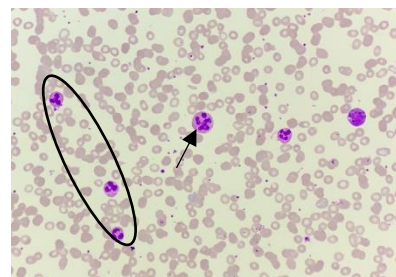


Figura 29| Esfregaço de sangue periférico com coloração de Leishman onde são visíveis neutrófilos (círculo) e um neutrófilo hipersegmentado (seta). (ampliação x1000).

8.1.4. Hemoglobina glicada (HbA1C)

A hemoglobina glicada (HbA1C) é realizada no sector de hematologia e tem como objetivo avaliar os níveis de glicose nos últimos 3 meses sendo determinada em utentes com Diabetes Mellitus (DM). Pode ser usada no diagnóstico, quando o valor da HbA1C é superior a 6,5%, e é útil na monitorização de DM²³.

A HbA1c resulta de uma reação de glicação entre a glicose que circula na corrente sanguínea com grupos amina livres presentes na hemoglobina e, por isso só é eliminada após o fim de vida do glóbulo vermelho, que é após 120 dias²³. A deteção desta variante da hemoglobina é um parâmetro importante uma vez que permitir avaliar a quantidade de glicose na corrente sanguínea nos últimos 3 meses e desta forma avaliar se a diabetes do paciente estão controlados com o tratamento proposto e avaliar se o utente toma a medicação corretamente²³.

No laboratório Avelab a determinação da HbA1c é realizada no aparelho automático HbNext. No sector de hematologia existem 2 equipamentos HbNext sendo que um deles apresenta apenas o modo variante, ou seja, realiza a medição da HbA1C. O segundo a aparelho apresenta o modo variante e Talassemia e, por isso, determina a HbA1C e realiza o rastreio de hemoglobinopatias. Este aparelho automatizado é um analisador de HPLC de troca iónica de fase reversa que foi concebido para fornecer valores precisos de exatos de HbA1C, HbA2, HbF e das principais variantes de hemoglobina¹⁹.

8.2. Patologias associadas a alterações dos componentes sanguíneos

Existem diversas patologias que estão associadas a alterações dos componentes sanguíneos, como anemias, leucemias e processos infecciosos. Assim, irei apresentar casos clínicos que tive contacto ao longo do meu estágio, desenvolvendo as patologias apresentadas.

8.2.1. Anemia

A anemia é definida como uma redução da concentração hemoglobina no sangue, apresentando valores abaixo dos valores de referência para a idade e o sexo²¹. Associados a estes valores também os valores de MCV e de MCH permitem a classificação das anemias em microcíticas, normocíticas e macrocíticas e em hipocrómicas, normocrómicas e hiperocrómicas, se os valores se encontrarem abaixo, de acordo ou acima dos valores de referência, respetivamente. A anemia pode resultar de hemorragias, defeitos de produção ou de hemólise²¹.

8.2.1.1 Anemia por deficiência de ferro

A anemia por deficiência de ferro é causada por níveis de ferro baixos que pode ser por dieta pobre em ferro, má absorção ou hemorragias crónicas nomeadamente a nível uterino e gastrointestinal²¹. A anemia por deficiência de ferro tem uma elevada incidência na infância, na adolescência, na gravidez e em mulheres menstruadas²¹.

Caso Clínico: Um homem de 62 anos realizou análises no laboratório Avelab apresentando a prescrição para hemograma e dosagem de ferro e ferritina. Os resultados das análises encontram-se na Tabela V. Perante os resultados do hemograma, observou-se que o utente apresentava anemia microcítica e hipocrômica, uma vez que apresenta os valores de hemoglobina e dos parâmetros MCV e MCH diminuídos, desta forma foi realizado o esfregaço sanguíneo de forma a verificar se apresentava características deste tipo de anemia. No esfregaço sanguíneo, representado na Figura 30, observou-se anisopoiquilocitose acentuada com eritrócitos em charuto, em lágrima e em alvo. Também se observaram neutrófilos em bastão e plaquetas gigantes. O doente apresentava as características de anemia por deficiência de ferro o que foi confirmado pelos valores do ferro e da ferritina (Tabela V), que estavam abaixo dos valores de referência. De salientar que o utente apresentava plaquetas elevadas o que é comum acontecer quando existem hemorragias crónicas,

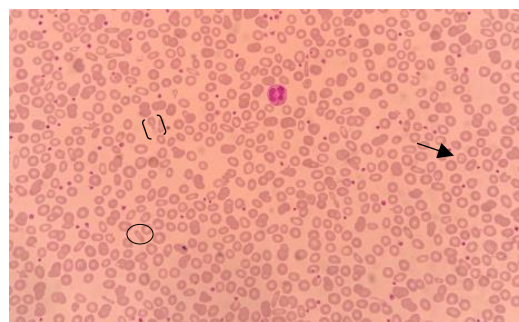


Figura 30| Esfregaço de sangue periférico com anisopoiquilocitose acentuada com eritrócitos em charuto (círculo), em lágrima ([]) e em alvo (seta). Plaquetas gigantes e neutrófilos em bastão (ampliação x1000).

Tabela V| Resultados do hemograma e da quantificação de ferro e ferritina.

Parâmetros	Resultados	Valores de referência
WBC	$9,13 \times 10^3 \mu L$	$4,00-11,00 \times 10^3 \mu L$
RBC	$5,16 \times 10^{12} \mu L$	$4,50-5,50 \times 10^{12} \mu L$
HGB	9,7 g/dL	13,0-17,0 g/dL
HCT	35,2 g/dL	40,0-50,0 g/dL
MCV	68,2 fL	83,0-101,0 fl
MCH	18,8 pg	27,0-34,0 pg
MHGM	27,6 g/dL	31,5-34,5 g/dL
PLT	$464 \times 10^9 \mu L$	$150-400 \times 10^9 \mu L$
RDW	23,3%	11,5-14,5 %
Neutrófilos	73,4%	$6,7 \times 10^9 \mu L$
Linfócitos	17,0%	$1,6 \times 10^9 \mu L$
Monócitos	6,8%	$0,6 \times 10^9 \mu L$
Basófilos	0,8%	$0,1 \times 10^9 \mu L$
Eosinófilos	2,0%	$0,2 \times 10^9 \mu L$
Ferro	14 μL	65-175 μL
Ferritina	11 ng/mL	20-250 ng/mL

nomeadamente a nível gastrointestinal²¹. O facto de apresentar neutrófilos em bastão é indicativo que o utente poderá apresentar alguma infeção ou poderá estar associada a alguma patologia neoplásica²¹. Desta forma, o utente pode ter algum distúrbio a nível gastrointestinal, uma vez que em homens e mulheres na pós-menopausa, a perda de sangue gastrointestinal é a principal causa de deficiência de ferro. Para confirmar esta situação seria necessário ter mais informação acerca da história clínica e seriam necessários outros exames para se confirmar este diagnóstico.

8.2.2. Leucemia mieloide crónica (LMC)

A leucemia mieloide crónica é uma doença clonal de uma célula-tronco pluripotente que sofre transformação maligna e mieloproliferação clonal causando uma superprodução de granulócitos maduros e imaturos²¹. É caracterizada por ser a neoplasia mieloproliferativa mais frequente, representando 15% de todas as leucemias dos adultos e pode surgir em qualquer idade, apesar de que apresentar uma maior incidência entre os 40 a 60 anos²¹.

O diagnóstico de LMC, em 50% dos casos, é realizado a partir de hemogramas de rotina²¹. Esta patologia é caracterizada por apresentar uma leucocitose acentuada e pela observação de formas imaturas da linhagem mieloide no esfregaço do sangue periférico como promielócito, mielócitos e metamielócitos. Também é caracterizada por apresentar basofilia, eosinofilia, anemia normocítica normocrômica e plaquetas normalmente, aumentadas, mas também pode estar dentro dos valores de referência ou abaixo²¹.

Caso clínico: Uma senhora de 65 anos dirigiu-se ao laboratório Avelab, no mês de abril de 2023, para realizar análises de rotina. Os resultados encontram-se na Tabela VI.

No resultado do hemograma detetou-se uma leucocitose acentuada e por isso analisou-se o histórico clínico. A utente já tinha realizado análises no laboratório, no mês de novembro de 2021, e não tinham sido observadas alterações significativas. Assim, avaliaram-se os resultados da velocidade de sedimentação e da proteína C reativa para averiguar se a utente apresentava um processo inflamatório ou algum tipo de infeção. Os valores encontravam-se dentro dos valores de referência (Tabela VI). O único parâmetro que se encontrava com valores acima do normal foi da desidrogenase do lactato (LDH) o que é sugestivo de que pode está a ocorrer lesão óssea, ou seja, há um aumento de destruição celular.

Realizou-se o esfregaço de sangue periférico e foram observados promielócitos, mielócitos, metamielócitos, eritroblastos, basófilos, neutrófilos e eosinófilos (Figura 31). Procedeu-se à contagem das células para confirmar os valores obtidos pelo aparelho e foram concordantes. Perante os resultados do hemograma, a leucocitose acentuada, basofilia, neutrofilia, ligeira trombocitose, os valores altos de LDH e a observação de células imaturas da linhagem mieloide, a utente foi encaminhada para o hospital com diagnóstico de potencial síndrome mieloproliferativa. É muito comum este tipo de características estar associada a LMC, mas para

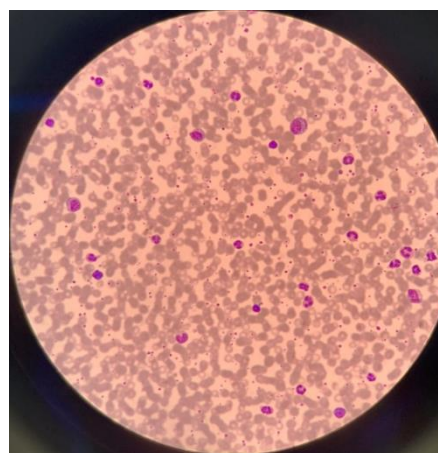


Figura 31| Esfregaço de sangue periférico com células imaturas da linhagem granulocítica estando presentes promielócitos, mielócitos, metamielócitos e neutrófilos em bastão e segmentados.

confirmar este diagnóstico seriam necessários mais exames como a detecção do gene *BCR-ABL1* ou do cromossoma Philadelphia, que está presente em 98% dos casos de LMC²¹. Além disso, também pode ser realizado um medulograma para observar se existe hipercleruidade com predominância granulopoiética que é muito usual neste tipo de patologias²¹.

Tabela VI | Resultados do hemograma e dos valores de VS, PCR e LDH.

Parâmetros	Resultados		Valores de referência
WBC	37,30 x 10³ μL		4,00-11,00 x 10 ³ μL
RBC	4,77 x 10 ¹² μL		3,80-4,80 x 10 ¹² μL
HGB	13,5 g/dL		12,0-15,0 g/dL
HCT	40,7 %		36,0-46,0 %
MCV	85,3 fl		83,0-101,0 fl
MGH	28,3 pg		24,0-34,0 pg
MHGM	33,2 g/dL		31,5-34,5 g/dL
PLT	535 x 10⁹ μL		150-400 x 10⁹ μL
RDW	17,1%		11,5-14,5%
Neutrófilos	40.0%	14,9 x 10⁹ μL	1,5-6,9 x 10 ⁹ μL
Linfócitos	6.0%	2,2 x 10 ⁹ μL	1,5-4,0 x 10 ⁹ μL
Monócitos	9.0%	3,4x10⁹ μL	0,2-0,8 x 10 ⁹ μL
Basófilos	10.0%	3,7x10⁹ μL	<0,1 x 10 ⁹ μL
Eosinófilos	8.0%	3,0x10⁹ μL	<0,4 x 10 ⁹ μL
Mielócitos neutrófilos	12,0%		-
Metamielócitos neutrófilos	6,0%		-
Bastonetes	9,0%		-
Promielócitos	2%		-
Eritroblastos	2 por cada 100 leucócitos		-
LDH	347 U/L		125-220 U/L
VS	3 mm		<30 mm
PCR	<5 mg/L		<5 mg/L

8.3. Hemostase e coagulação

A hemostase é um processo altamente regulado e qualquer alteração neste mecanismo pode levar a hemorragias ou trombose¹⁹. Este processo desempenha várias funções que são cruciais para o normal funcionamento do organismo sendo responsável por manter a fluidez do sangue, por interromper um sangramento local devido a uma lesão e por remover o tampão hemostático quando a cicatrização se completa¹⁹.

Os vasos sanguíneos, as plaquetas, os fatores de coagulação do plasma e os seus inibidores e o sistema fibrinolítico são componentes fundamentais para a regulação da hemostase¹⁹. Este

processo divide-se em hemostase primária, hemostase secundária e fibrinólise²¹. A hemostase primária consiste na formação de um trombo plaquetário de forma a estancar a hemorragia na presença de uma lesão vascular²¹. As principais etapas deste processo são a adesão, ativação, libertação e agregação de plaquetas^{19,21}. A hemostase secundária envolve uma cascata de reações, denominada de cascata da coagulação, que tem como objetivo tornar os coágulos primários instáveis em coágulos firmes e estáveis através da conversão de fibrinogénio em fibrina^{19,21}.

A cascata da coagulação é caracterizada por apresentar duas vias, a via extrínseca e a via intrínseca (Figura 32). A cascata tem início pela via extrínseca, que consiste na ligação do fator tecidual (TF), que é exposto após a lesão vascular, ao fator VII originando um complexo ativado (VIIa-TF) que vai ativar o fator IX e X levando à formação do fator Xa que converte a protrombina em trombina. Contudo, como não está presente o seu cofator, são produzidas apenas pequenas quantidades de trombina e por isso é necessário amplificar este processo^{19,21}. Desta forma,

inicia-se a via intrínseca, que devido à presença de trombina vai promover a libertação do fator de Von Willebrand (VWF) que transporta o fator VIII e além disso também vai ativar o fator V²¹. O fator VIIIa e o fator IXa na presença de cálcio e de fosfolípidos vai ativar o fator Xa que com o fator Va, cálcio e fosfolípidos da membrana converte a protrombina em trombina, formando-se grandes quantidades. A trombina, por sua vez, vai atuar no fibrinogénio originando a fibrina e vai ativar o fator XIII que vai reagir com os polímeros de fibrina de forma a torná-la mais estável. A fibrina mais estável dá origem a um coágulo estável²¹.

A fibrinólise tem como objetivo a dissolução do coágulo que ocorre pela presença de proteínas ativadoras e inibidoras que vão converter o plasminogénio em plasmina e esta por sua vez vai atuar na fibrina convertendo-a em produtos solúveis²¹.

No sector de hematologia existe uma sala dedicada às análises da hemostase e da coagulação. As análises são realizadas em tubos com anticoagulante de citrato que quando são rececionados são centrifugados a 4230 rpm durante 15 minutos. Posteriormente, são colocados no equipamento STA Compact Max que é um aparelho automático que realiza as análises dos parâmetros da coagulação através do método cronométrico^{24,25}. Este método funciona com um sistema de cuvetes que contêm esferas metálicas que oscilam devido à

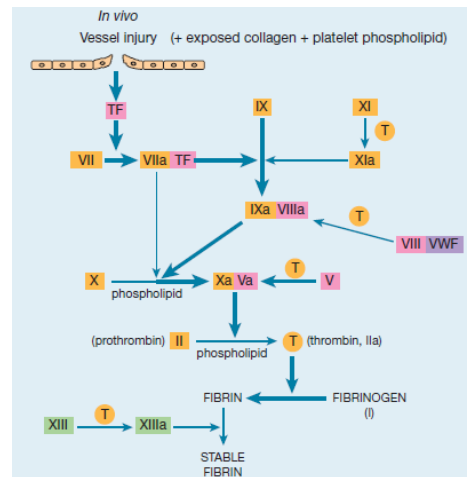


Figura 32 | Mecanismo da cascata da coagulação²¹

presença de um campo magnético e que param quando se forma o coágulo²⁶. O sistema mede a amplitude de oscilação da esfera metálica através do método cronométrico que irá corresponder ao tempo de coagulação.²⁴ Através deste método o equipamento não está sujeito a interferências, nomeadamente à hemólise e à lipémia^{24,25}.

O equipamento realiza a análise dos seguintes parâmetros:

- **Tempo de protrombina (PT):** mede o tempo de coagulação na presença de um extrato celular (tromboplastina) e indica a eficiência global da via extrínseca, avaliando os fatores VII, II, V, X e fibrinogénio^{19,21}. O tempo normal da coagulação é de 10 a 14 segundos¹⁹. Pode ser expresso como uma razão normalizada internacional (INR)^{19,21}.
- **Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (APTT):** mede o tempo de coagulação do plasma, depois de ativação dos fatores de contacto, sem adição do fator tecidual. Indica globalmente a eficácia da via intrínseca, avaliando os fatores II, V, X, XII, XI, IX, VIII e fibrinogénio^{19,21}. O tempo normal de coagulação é de 30 a 40 segundos.
- **Tempo de Trombina (TT):** consiste em adicionar trombina ao plasma do utente e medir o tempo de coagulação, que é normalmente de 14 a 16 segundos²¹.
- **Fibrinogénio:** é uma glicoproteína envolvida na etapa final da coagulação e que avalia a capacidade de conversão do fibrinogénio em fibrina por ação da trombina^{19,21}. A sua quantificação é realizada pelo método de referência *Clauss*^{19,24}. Este método consiste em adicionar ao plasma diluído um excesso de trombina para que o tempo de coagulação dependa da quantidade de fibrinogénio¹⁹.
- **D-Dímeros (DD):** é uma medida dos produtos de degradação de fibrina e por isso indica a atividade da plasmina^{19,25}. A sua determinação é realizada pelo método de imunoturbidimetria que consiste em adicionar uma suspensão de partículas de látex revestidas com um anticorpo monoclonal com elevada especificidade para o D-dímero. Ocorre a ligação do anticorpo com o D-dímero formando um complexo e por isso a formação dos complexos é proporcional à quantidade de D-dímeros presentes. A formação dos complexos resulta numa diminuição da luz transmitida e essa diminuição é detetada pelo equipamento^{19,25}.

8.3.1. Distúrbios da coagulação e terapia anticoagulante

Existem alterações na hemostase como distúrbios vasculares, trombocitopenia, defeitos na coagulação e defeitos na função plaquetária que resultam em hemorragias porque o sangue coagula mais lentamente do que o normal, resultando num sangramento contínuo, ou resulta

na formação de trombos, porque o sangue coagula rápido de mais²¹. A formação de trombos está envolvida em situações de enfarto de miocárdio, trombose venosa profunda e embolia pulmonar²¹. A incidência da trombose aumenta com a idade e também quando associada a fatores de risco como a gravidez e cirurgia. A trombofilia é a designação para distúrbios hereditários ou adquiridos da hemostase que predispõe à trombose²¹.

No sector da coagulação, as análises que são mais realizadas são o PT e APTT de forma a detetar essas alterações na hemostase e também se realiza o controlo de INR dos utentes com terapêutica anticoagulante. Pontualmente, realiza-se a análise de fibrinogénio e de D-dímeros.

De forma a prevenir a formação e propagação de trombos, os doentes com alterações na hemostase são sujeitos a terapia anticoagulante oral. A varfarina é o fármaco mais usado e é um antagonista da vitamina K, provocando uma diminuição da expressão dos fatores dependentes desta como é o caso dos fatores II, VII, IX e X^{19,21}. As respostas individuais ao tratamento com este tipo de fármacos são muito variáveis e, por isso, a dose diária deve ser monitorizada e ajustada através do INR de forma a manter um nível de hipocoagulidade para minimizar o risco de hemorragia e de trombose¹⁹.

O INR é calculado a partir da razão do PT do paciente e do PT médio normal elevado ao índice de sensibilidade internacional (ISI) (Figura 33)^{19,21}. O valor de INR de uma pessoa saudável é de 1, mas para pessoas com esta terapêutica o valor de INR é de 2 a 3²¹. No laboratório Avelab, este parâmetro é obtido diretamente a partir do equipamento e posteriormente o clínico, com os valores de PT e de INR, faz o ajuste da dose do fármaco caso o valor de INR se encontre abaixo ou acima dos valores pretendidos, aumentado ou diminuindo a medicação, respetivamente.

$$INR = \left(\frac{PT_{paciente}}{PT_{normal}} \right)^{ISI}$$

Figura 33| Fórmula do cálculo de INR^{20,21}.

8.4. Imunohematologia

No setor da coagulação também se realiza o teste de Coombs direto e indireto e a determinação do grupo sanguíneo.

8.4.1. Determinação dos grupos sanguíneos

A determinação dos grupos sanguíneos é importante para a realização de transfusões de sangue.^{18,20} Os grupos sanguíneos são determinados pelo sistema ABO e Rh. O sistema ABO baseia-se na presença de antígenos A e/ou antígenos B nos eritrócitos e pela ausência de anticorpos anti-A e/ou anti-B no plasma ou soro^{19,21}. O sistema Rh baseia-se na presença de antígenos D nos eritrócitos. Desta forma para determinar o grupo sanguíneo é importante detectar a presença de antígenos nos glóbulos vermelhos.

No laboratório Avelab essa determinação é realizada através de uma tecnologia de aglutinação em coluna do sistema ORTHO BioVue. Este sistema é constituído por cassetes compostas por microtúbulos, sendo que em cada microtúbulo tem uma coluna de gel com anticorpos anti-A, anti-B e anti-D (Figura 34).

Antes de dar início ao procedimento, os tubos de sangue rececionados são centrifugados a 3000 rpm durante 5 minutos de forma a obter a separação das células sanguíneas do plasma. Posteriormente, realiza-se uma diluição do sangue total em soro fisiológico, colocando-se 190 µL de soro fisiológico e 10 µL de células sanguíneas. Pipetam-se 10 µL e colocam-se em três microtúbulos, no anti-A, anti-B e anti-D. De seguida centrifuga-se no aparelho Ortho Workstation durante 5 minutos e faz-se a leitura da cassette consoante os critérios presentes na Tabela VII e na Tabela VIII. A coluna de gel, presente nos

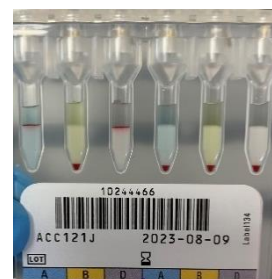


Figura 34 | Cassete com a determinação de dois grupos sanguíneos. O primeiro é do grupo A positivo e o segundo do grupo O negativo.

microtúbulos, tem esferas que funcionam como um filtro: se ocorrer aglutinação dos eritrócitos com os anti-soros impede a passagem para o fundo do microtúbulo, quando sujeita a centrifugação, formando-se uma banda no topo da coluna; se não ocorrer aglutinação estes passam para o fundo da coluna. Quando há aglutinação significa que está presente o antígeno que lhe corresponde. Na Figura 34 estão representadas duas análises sanguíneas como exemplo: o primeiro é grupo A positivo e o segundo é do grupo O negativo. De salientar que se o resultado anti-D for negativo é necessário realizar um segundo teste para confirmação que consiste em usar uma cassette *polyspecific*, como a representada na Figura 35, e adiciona-se 40 µL de soro anti-D num poço da cassette e 10 µL da suspensão de células do utente. Após a incubação durante 15 minutos, centrifuga-se durante 5 minutos e realiza-se leitura. Se confirmar a negatividade, o resultado é emitido.

Tabela VIII Interpretação do sistema ABO.

Grupo sanguíneo	Anti-A	Anti-B
A	+	-
B	-	+
AB	+	+
O	-	-

Tabela VIII Interpretação do sistema Rh.

Grupo Rh	Anti-D
Positivo	+
Negativo	-

+: Aglutinação;
-: sem aglutinação

8.4.2. Teste de Coombs direto e indireto

O teste antiglobulina (Coombs) é um teste fundamental e muito utilizado na serologia dos grupos sanguíneos e na imunologia geral²¹. Esta análise apresenta uma elevada importância clínica em indivíduos D negativos que podem ser estimulados, através de transfusões de sangue e na gravidez, a produzir anticorpos anti-D^{19,21}. Quando uma mulher Rh negativa engravida com um feto Rh positivo, os eritrócitos do feto atravessam para a circulação materna, nomeadamente durante o parto ou durante o terceiro trimestre, e sensibilizam a mãe para a formação de anticorpos anti-D. Esta sensibilização também pode ocorrer devido a abortos espontâneos, amniocentese ou transfusão de sangue²¹. A mulher Rh negativa ao apresentar anticorpos anti-D vai levar a que numa gestação futura, com um feto Rh positivo, ocorra a doença hemolítica do recém-nascido, uma vez que anticorpos IgG atravessam a placenta o que irá provocar a destruição das células do feto que pode resultar na sua morte.^{18,20} Desta forma, o teste de Coombs é realizado para que seja possível administrar IgG anti-D às 28 semanas de gestação de forma a prevenir as implicações graves do feto²¹.

O teste de Coombs consiste em detetar a presença ou a ausência do antígeno D nos eritrócitos. Pode ser um teste direto ou indireto, sendo que o primeiro consiste em detetar anticorpos ou complemento na superfície dos eritrócitos, onde já ocorreu sensibilização *in vivo*. Já o teste de Coombs indireto consiste na pesquisa de anticorpos no soro ou plasma do indivíduo^{19,21}. No laboratório Avelab são realizadas as duas análises, mas durante o meu estágio apenas tive oportunidade de realizar o Coombs indireto. Este teste consiste em usar o kit da Ortho Biovue Systems que contém cassetes com Anti-IgG polyspecific. O processo tem início com a centrifugação do tubo de sangue a 3000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, coloca-se 50 µL de 0,8% de SELECTOGEN, que é constituído por dois tipos de glóbulos vermelhos humanos do grupo 0 (células I e II), em dois microtúbulos e adiciona-se 40 µL do plasma do utente. Após incubação durante 15 minutos no equipamento Ortho



Figura 35 Cassete usada no Teste de Coombs com 2 resultados negativos e um resultado positivo (+2).

Workstation é centrifugado durante 5 minutos e faz-se a leitura. Se não ocorrer aglutinação resultado é negativo como se observa na Figura 35 nos primeiros quatro microtúbulos. Se ocorrer aglutinação, o plasma vai formar uma banda no topo do microtúbulo ou vai ficar ao longo da coluna com vários graus de aglutinação. Na Figura 35 é possível observar um resultado positivo que apresenta um grau de aglutinação de +2 (Figura 36).

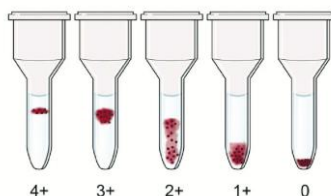


Figura 36] Esquema da classificação da aglutinação em coluna. Sendo a interpretação: **0-**Todas as células passam pelas contas e formam um botão na parte inferior da coluna de contas; **1+** - A maioria das células aglutinadas permanece na metade inferior da coluna do grânulo. Um botão de células também ficará visível na parte inferior da coluna da conta; **2+**: Células aglutinadas observadas ao longo do comprimento da coluna de esferas. Um pequeno botão de células também pode ser visível na parte inferior da coluna de esferas; **3+**: A maioria das células aglutinadas permanece na metade superior da coluna do grânulo; **4+**: Células aglutinadas formam uma banda no topo da coluna de esferas²⁸.

9. Conclusão

A realização do estágio curricular, com a duração de 6 meses, no Laboratório Médico de Análises Clínicas Avelab permitiu-me colocar em prática os conhecimentos teóricos e práticos adquiridos ao longo de Mestrado de Análises Clínicas. Além disso, tive a possibilidade de aprofundar os meus conhecimentos e de estar em contacto com a dinâmica da atividade laboratorial e com as diversas realidades clínicas.

Durante o estágio, tive a possibilidade de passar por todos os setores do laboratório o que me permitiu ter uma visão global de como funcionam todas as áreas envolvidas nas análises clínicas. No setor de Microbiologia tive a oportunidade de desenvolver competências práticas a nível de realização de sementeiras de produtos biológicos e da respetiva interpretação tal como na observação ao microscópico das diferentes amostras, tendo sempre por base os conhecimentos teóricos. No setor de Hematologia desenvolvi competências tanto a nível da interpretação dos resultados fornecidos pelos equipamentos automáticos como na observação ao microscópio de esfregaços sanguíneos, tendo sido uma mais-valia para a minha experiência profissional, uma vez que tive oportunidade de observar e avaliar as diferentes células sanguíneas e de detetar diferentes patologias associadas a distúrbios sanguíneos. Além disso, tive oportunidade de realizar testes de Coombs e de determinar grupos sanguíneos.

A área de Biologia Molecular surpreendeu-me pela positiva, uma vez que permitiu aprofundar os meus conhecimentos teóricos e colocá-los em prática. Além disso, demonstrou ser uma área que irá ter um papel fundamental no futuro das análises clínicas, uma vez que estão a ser implementados novos métodos de deteção, nomeadamente na deteção de diferentes patógenos, permitindo a obtenção de um diagnóstico de forma mais rápida, mais específica e mais sensível.

Aprendi a ser autónoma, a trabalhar em equipa e a ter espírito crítico na tomada de decisões. Na validação dos resultados, a história clínica tem um papel fundamental na interpretação dos resultados. Contudo, como o laboratório Avelab é um laboratório privado, realizando maioritariamente análises de rotina nem sempre se tem acesso ao historial clínico.

Em suma, este estágio permitiu o meu desenvolvimento tanto a nível pessoal como a nível profissional e juntamente com os conhecimentos adquiridos na vertente letiva do mestrado preparou-me para a próxima etapa, a entrada no mercado de trabalho.

10. Bibliografia

1. GOSWAMI B.; SINGH B.; CHAWLA R.; MALLIKA V. - **Evaluation of errors in a clinical laboratory: a one-year experience.** Clin Chem Lab Med. 2010;48(1):63-6. doi: 10.1515/CCLM.2010.006. PMID: 20047530.
2. PLEBANI, Mario - **"Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine?"** *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, vol. 44, n° 6, 2006, pp. 750-759.
3. Assembleia da República. - **Despacho n° 10009/2019.** Diário da República n°212, série II de 05-11-2019, páginas 66-80.
4. WESTGARD, JO; BARRY, PL; HUNT,MT; GROTH,T.- **A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry.** Clin Chem. 1981 Mar;27(3):493-501. PMID: 7471403.
5. MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. - **Medical Microbiology.** 8ª Ed. Philadelphia: Elsevier, 2016. ISBN: 978-0-323-29956-5.
6. MAHON, Connie R.; LEHMAN, Donald C. - **Textbook of Diagnostic Microbiology.** 6ª Ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2019. ISBN: 978-0-323-48218-9.
7. NESTER, Eugene W. et al. - **Microbiology A Human Perspective.** 6ª Ed. New York: The McGraw-Hill Companies, 2012. ISBN: 978-0-07-337531-1.
8. FORBES, Betty A.; SAHM, Daniel F.; WEISSFELD, Alice S. - **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology.** 12ª Ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007. ISBN: 978-0-323-03065-6.
9. ROSA-FRAILE M.; SPELLERBERG B. - **Reliable Detection of Group B Streptococcus in the Clinical Laboratory.** J Clin Microbiol. 2017 Sep;55(9):2590-2598. doi: 10.1128/JCM.00582-17. Epub 2017 Jun 28. PMID: 28659318; PMCID: PMC5648696.
10. PINCUS, David H. – **Microbial identification using the bioMérieux Vitek 2 system.** Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods. Bethesda, MD: Parenteral Drug Association 2006 (2006): 1-32.
11. CHANG S.L.; SHORTLIFFE L.D. - **Pediatric Urinary Tract Infections, Pediatric Clinics of North America,** Volume 53, Issue 3, 2006, Pages 379-400, ISSN 0031-3955, ISBN 9781416035404, <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2006.02.011>

12. TAMADONFAR K.O; OMATTAGE N.S.; SPAULDING C.N.; HULTGREN S.J. - **Reaching the End of the Line: Urinary Tract Infections.** Microbiol Spectr. 2019 May;7(3). doi: 10.1128/microbiolspec.BAI-0014-2019. PMID: 31172909.

13. HOVELIUS B.; MARDH P.A. - **Staphylococcus saprophyticus as a common cause of urinary tract infections.** Rev Infect Dis. 1984 May-Jun;6(3):328-37. doi: 10.1093/clinids/6.3.328. PMID: 6377440.

14. MERLINO J.; SIARAKAS S.; ROBERTSON G.J.; FUNNELL G.T; GOTTLIEB T.; BRADBURY R. - **Evaluation of CHROMagar Orientation for differentiation and presumptive identification of gram-negative bacilli and Enterococcus species.** J Clin Microbiol. 1996 Jul;34(7):1788-93. doi: 10.1128/JCM.34.7.1788-1793.1996. Erratum in: J Clin Microbiol 1997 Aug;35(8):2190. PMID: 8784591; PMCID: PMC229116.

15. BESSESEN M.T.; KOTTER C.V; WAGNER B.D.; ADAMS J.C. KINGERY S.; BENOIT J.B.; ROBERTSON C.E.; JANOFF E.N; FRANK D.N. - **MRSA colonization and the nasal microbiome in adults at high risk of colonization and infection.** J Infect. 2015 Dec;71(6):649-57. doi: 10.1016/j.jinf.2015.08.008. Epub 2015 Sep 1. PMID: 26335708.

16. WARNKE P.; FRICKMANN H.; OTTL P.; PODBIELSKI A. - **Nasal screening for MRSA: different swabs--different results!** PLoS One. 2014 Oct 29;9(10): e111627. doi: 10.1371/journal.pone.0111627. PMID: 25353631; PMCID: PMC4213029.

17. YOO Y.J.; KWAK E.J.; JEONG K.M.; BAEK Y.S. - **Knowledge, attitudes and practices regarding methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infection control and nasal MRSA carriage rate among dental health-care professionals.** Int Dent J. 2018 Oct;68(5):359-366. doi: 10.1111/idj.12388. Epub 2018 Mar 25. PMID: 29577266; PMCID: PMC9379031.

18. FILKINS, Laura; HAUSER, Jocelyn; ROBINSON-DUNN, Barbara; TIBBETTS, Robert; BOYANTON, Bobby; REVELL Paula. - **Guidelines or the detection and identification of Group B Streptococcus.** American Society for Microbiology Clinical. 2021.

19. BAIN Barbara J. et al. - **Dacie and Lewis Practical Haematology.** 11^ªEd. Churchill Livingstone, Elsevier Limited, 2011. ISBN: 9780702034084

20. SANTOS V.M.; CUNHA S.F.; CUNHA D.F. - **Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações** Rev Assoc Med Bras (1992). 2000 Jul-Sep;46(3):232-6. Portuguese. doi: 10.1590/s0104-42302000000300008. PMID: 11070514.

21. HOFFBRANS A. Victor; MOSS Paul A.H. - **Hoffbransd's Essential Haematology**, 7ª Ed. The Attrin, Southern Gate, Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons LDL, 2016. ISBN:978-118-40867-4.
22. A.MENARINI diagnostics - **Evaluation of Hb NEXT, the A.Menarini Diagnostics new generation HPLC analyzer for HbA1c detection**. <https://www.menarinidiagnostics.com/Portals/20/pdf/WVP%20HBnext%20March%202022%20rev.pdf>
23. BURTIS, Carl A.; BRUNS David E. - **Tietz fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics**. 7ªEd. St. Louis: Elsevier Saunders, 2015. ISBN:978-1-4557-4165-6
24. STAGO-US - **Hemostasis Catalogue**. 2019. https://www.stago-us.com/sites/stago_us/files/2022-12/2019_USProduct_Catalog_lowres.pdf
25. FDA, **STA COMPACT MAX**. https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf13/K130090.pdf
26. SYSMEX, **Tecnologia e parâmetros clínicos avançados, Aparelhos Hematológicos Automatizados Série-XN**. <https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Documents/XN-Tecnologia-Portugu%C3%AAs.pdf>
27. SYSMEX, **Novo Design Novas Possibilidades, Aparelhos Hematológicos Automatizados Série-XN**. <https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Documents/XN-Portugu%C3%AAs.pdf>
28. HUR, MINA & MOON, HEE-WON & KWON, SEOG - **ABO-incompatible Kidney Transplantation**, 2011. 10.5772/20514.
29. INSTITUTO DE MEDICINA (EUA). - **Informando o futuro: Questões Críticas em Saúde**. Segunda Edição. Washington (DC): National Academies Press (EUA); 2003. SAÚDE GLOBAL E DOENÇAS INFECCIOSAS. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK216159/>