



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Betania Cristina Teixeira de Freitas

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas orientada pela Doutora Susana Isabel Fernandes Pereira Agostinho Gouveia e pela Professora Doutora Olga Maria Antunes Rodrigues Carvalho Cardoso e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2020



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Betania Cristina Teixeira De Freitas

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

**Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas,
orientado pela Doutora Susana Isabel Fernandes Pereira Agostinho Gouveia e
pela Professora Doutora Olga Maria Antunes Rodrigues Carvalho Cardoso e
apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.**

Outubro de 2020

Agradecimentos

Termina assim mais um ciclo da minha vida e não o fiz sozinha.

À professora Ana Miguel, coordenadora do Mestrado em Análises Clínicas, que tratou de toda a logística para tornar este estágio possível;

À professora Olga Cardoso, minha orientadora interna, que sempre se prontificou a ajudar-me e por ter sido a melhor professora de Microbiologia que tive;

À Dra. Susana Agostinho, minha orientadora externa, pela oportunidade que me concedeu em estagiar no seu laboratório e que apesar do fluxo de trabalho sempre arranjou um tempinho para mim;

À Águeda Velosa pela paciência e pelo carinho, e por constituir um exemplo de mulher de valores que eu admiro.

À Dra. Joana Andrade, por toda a partilha de conhecimento e discussões de casos clínicos, que tornou a minha experiência mais enriquecedora e me manteve motivada.

À Dra Jenny e ao Luís pela boa disposição e por me terem feito rir nos momentos em que estive mais em baixo.

Ao Sandro Lopes por todo o companheirismo e partilha de conhecimentos no decurso deste mestrado, mas acima de tudo por ter sido um grande amigo.

À Carina Lopes por toda a partilha de desabafos no transcurso deste estágio e por estar sempre disposta a ajudar-me no que fosse preciso.

À Márcia Gonçalves pela excelente amiga que tem sido ao longo destes loucos anos 20 e que foi sempre a minha companhia das intermináveis noites de estudo, mas também das noites de lazer.

Ao 1ºesquerdo da RAJA, que foi o meu lar em Coimbra e que me recebeu de braços abertos.

E por fim às minhas irmãs e aos meus pais, pelo amor e apoio incondicional e por todo o esforço que fazem para que eu tenha acesso a todas as ferramentas para viver uma vida plena.

Índice

Índice de figuras	vi
Índice de tabelas	vii
Lista de abreviaturas	viii
Resumo	xi
Abstract	xi
1. Introdução	1
2. Caracterização do laboratório	1
2.1. Fase pré-analítica	2
2.2. Fase analítica	3
2.3. Fase pós analítica	4
3. Controlo de qualidade	4
3.1. Controlo de Qualidade Interno.....	4
3.2. Avaliação Externa de Qualidade	5
4. Hematologia	6
4.1. Hematopoiese	6
4.2. Hemograma	7
4.2.1. Eritrograma	8
a. Contagem de eritrócitos.....	8
b. Concentração de hemoglobina	9
c. Hematócrito.....	9
d. Índices Eritrocitários	9
e. Contagem de reticulócitos	9
4.2.2. Leucograma.....	11
4.2.3. Plaquetograma	11
4.3. Esfregaço Sanguíneo.....	12
4.3.1. Avaliação da série eritrocitária.....	13
a. Cor	13
b. Tamanho	14
c. Forma.....	15
d. Distribuição	16
e. Inclusões.....	17
4.3.2. Avaliação da série leucocitária.....	17
4.3.3. Avaliação da série plaquetária.....	19

4.4. Hemostase	20
4.4.1. Testes de <i>screening</i> de coagulação	21
a. Tempo de Protrombina	22
b. Tempo de Tromboplastina Activada	22
c. Fibrinogénio.....	23
4.5. Velocidade de sedimentação.....	23
4.6. Grupos sanguíneos.....	24
5. Microbiologia.....	25
5.1. Urocultura.....	25
5.1.1. Análise sumária da urina	27
5.1.2. Quantificação de microrganismos.....	28
5.2. Fezes.....	29
5.2.1. Coprocultura	30
5.2.2. Exame parasitológico	31
5.2.3. Pesquisa de Adenovírus e Rotavírus	32
5.2.4. Pesquisa de <i>Clostridium difficile</i>	32
5.3. Exsudados vaginais e uretrais.....	33
5.3.1. Pesquisa de <i>Trichomonas vaginalis</i>	34
5.3.2. Pesquisa de <i>Candida spp.</i>	34
5.3.3. Pesquisa de <i>Gardnerella vaginalis</i>	35
5.3.4. Pesquisa de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	35
5.3.5. Pesquisa de <i>Streptococcus agalactiae</i>	36
5.3.6. Pesquisa de <i>Clamidia trachomatis</i>	36
5.4. Secreções respiratórias.....	37
5.4.1. Exsudados nasais e faríngeos.....	37
a. Estudo da colonização de <i>Staphylococcus aureus</i> metilina resistente	37
b. Pesquisa de <i>Streptococcus</i> β -hemolítico do grupo A.....	38
5.4.2. Expectoração	39
5.5. Tecidos e exsudados purulentos de feridas	42
5.6. Líquidos orgânicos.....	42
5.7. Hemoculturas.....	43
5.8. Testes complementares de identificação	44
5.8.1. Teste da catalase.....	44
5.8.2. Teste da oxidase	44
5.9. VITEK®2 COMPACT.....	45

6. Imunologia.....	46
7. Bioquímica.....	48
8. Discussão de casos clínicos	50
8.1. Insuficiência renal crónica.....	50
8.2. Anemia ferropriva	52
8.3. Pé diabético	54
8.4. Candidúria.....	57
9. Conclusão	58
10. Bibliografia	59
11. Anexos	65
11.1. Anexo I – Técnica para a realização de um esfregaço de sangue periférico.	65
11.2. Anexo II – Coloração de Gram.	66
11.3. Anexo III – Coloração de Kinyoun.	67

Índice de figuras

Figura 1 - Hematopoiese.	7
Figura 2 - Índices eritrocitários e o seu interesse clínico.	14
Figura 3 - Eritrócitos ao lado de um linfócito.....	14
Figura 4 - Alguns exemplos de poiquilócitos com a respectiva associação clínica.	16
Figura 5 - Diferença entre aglutinação eritrocitária e rouleaux.....	17
Figura 6 - Leucócitos que aparecem normalmente no sangue periférico.	17
Figura 7 - Células brancas com morfologia alterada.	19
Figura 8 - Pseudotrombocitopenias no esfregaço sanguíneo periférico.....	20
Figura 9 - Cascata de coagulação.....	21
Figura 10 - Sedimento urinário com ampliação de 40x.....	28
Figura 11 - Uroculturas positivas com diferentes contagens.....	29
Figura 12 - Gram do exsudado vaginal de um indivíduo saudável com ampliação de 100x.	35
Figura 13 - Colónias hemolíticas na gelose de sangue	41
Figura 14 - Estudo morfológico do sangue periférico. Ampliação 100x.....	53
Figura 15 - Resultado do exame cultural.....	55
Figura 16 - Resultado da urocultura.	57
Figura 17 - Técnica para a realização de um esfregaço de sangue periférico	65

Índice de tabelas

Tabela I - Analisadores utilizados no LACSM e as suas respectivas metodologias.....	3
Tabela II - Índices eritrocitários e o seu interesse clínico.....	10
Tabela III - Alterações numéricas e possíveis causas associadas.	18
Tabela IV - Critérios de Murray e Washington.....	40
Tabela V - Cartas utilizadas no VITEK®2 COMPACT e a sua respectiva aplicação.....	46
Tabela VI - Parâmetros determinados pelos analisadores e a sua respectiva metodologia.	47
Tabela VII - Técnicas manuais na serologia.....	47
Tabela VIII - Parâmetros determinados na Bioquímica e a sua respectiva metodologia.	49
Tabela IX - Resultados laboratoriais obtidos.....	50
Tabela X - Resultados laboratoriais obtidos.	52
Tabela XI - Resultados laboratoriais obtidos.....	54
Tabela XII - Antibiograma validado.....	56
Tabela XIII - Kit Hemacolor®.	65
Tabela XIV - Reagentes da coloração de Gram.....	66
Tabela XV - Reagentes da coloração de Kinyoun.	67

Lista de abreviaturas

AEQ - Avaliação Externa de Qualidade

AFP – Alfa-fetoproteína

Ag – Antígeno

aPTT - Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

ATCC - *American Type Culture Collection*

ATG – Anticorpo anti-tiroglobulina

ATPO – Anticorpo anti-peroxidase

BAAR - Bacilos Ácido-Álcool Resistentes

BHI - *Brain Heart infusion*

CA – Antígeno Carbohidrato

CEA – Antígeno Carcinoembrionário

CHCM - Concentração de hemoglobina corpuscular média

CLED - Cistina Lactose Deficiente em Eletrólitos

CMI - Concentração Mínima Inibitória

CMV – Citomegalovírus

CQI - Controlo de Qualidade Interno

DGS - Direção-Geral da Saúde

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FPSA – PSA livre

FSH – Hormona Folículo-estimulante

FT3 – T3 livre

FT4 – T4 livre

HAV- Vírus da Hepatite A

HB – Hepatite B

Hb - Hemoglobina

HBc - Core do vírus da Hepatite B

HB_e – Envelope do vírus da Hepatite B

HB_s - Superfície do do vírus Hepatite B

HCM - Hemoglobina corpuscular média

HCV – Vírus da Hepatite C

HDL - Lipoproteína de alta densidade
HFR - Reticulócitos de elevada dispersão
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC - Cromatografia líquida de alta precisão
HPM – Hospital Particular da Madeira
HTC - Hematócrito
Ig – Imunoglobulina
INR - Razão Internacional Normalizada
ISI - Índice de sensibilidade internacional
ITU - Infecções no tracto urinário
LACSM - Laboratório de Análises Clínicas SYNLAB Madeira
LCR - Líquido cefalorraquidiano
LDL - Lipoproteína de baixa densidade
LFR - Reticulócitos de baixa dispersão
LH – Hormona Luteino-estimulante
MFR - Reticulócitos de média dispersão
MRSA - *Staphylococcus aureus* metilina resistente
MRSM - Meio chromID™ MRSA SMART
NEQAS - *National External Quality Assessment Scheme*
NK - Células Natural Killer
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PCT - Plaquetócrito
PDW - Índice de distribuição do tamanho plaquetário
P-LCR - Rácio de plaquetas gigantes
PNAEQ - *Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade*
PRL – Prolactina
PSA - Antígeno específico da próstata
PTH – Paratormona
RBC - Contagem de eritrócitos
RDW - Índice de Distribuição dos Eritrócitos
RIQAS - *Randox International Quality Assessment Scheme*
RNA - Ácido ribonucleico
SEHH - *Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia*
SEQC - *Sociedad Española de Medicina de Laboratorio*

SLS - Lauril Sulfato de Sódio
SS - Meio *Salmonella-Shigella*
T3 - Triiodotironina
T4 – Tiroxina
TF - Factor tecidual
TP - Tempo de Protrombina
TSH – Hormona estimulante da Tiróide
TST – Testosterona
UFC - Unidades Formadoras de Colónias
VBI2 – Vitamina B12
VCM - Volume corpuscular médio
VPM - Volume plaquetário médio
VRDL – *Veneral research disease laboratory*
VS - Velocidade de Sedimentação
VWF - Fator von Willebrand

Resumo

No presente relatório consta toda a aprendizagem teórica e prática adquirida durante o estágio curricular realizado no laboratório SYNLAB Madeira no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas. É feita uma abordagem sucinta das áreas de Imunologia e Bioquímica e uma mais detalhada na Hematologia e Microbiologia, que se debruça essencialmente nas metodologias que o laboratório dispõe para determinar os mais diversos parâmetros bem como todo o processamento e validação dos resultados referentes a estas duas últimas áreas. Este relatório dispõe ainda a discussão de casos clínicos que foram surgindo ao longo dos seis meses de estágio.

Abstract

This essay displays all the theoretical and practical learning acquired during the curricular internship fulfilled at the SYNLAB laboratory in Madeira, accomplished in the ambit of Clinical Analysis Master's Degree. It's approached in the areas of Immunology and Biochemistry a succinct description and a more detailed one in Haematology and Microbiology, which focuses essentially on the methodologies that the laboratory has to determine the most diverse parameters as well as the process and validation of the results related to these last two areas. This essay also addresses the discussion of clinical cases that have showed up over the six months of the internship.

I. Introdução

O presente relatório tem como objectivo descrever as actividades que desenvolvi no decurso do meu estágio curricular. O estágio foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas SYNLAB Madeira (LACSM) e teve a duração total de seis meses.

Neste estágio tive a oportunidade de desempenhar actividades laboratoriais nas valências da Bioquímica, Imunologia, Hematologia e Microbiologia. Além disso, também acompanhei a fase pré analítica em postos de colheitas e desempenhei funções na triagem que foram fulcrais para entender toda a dinâmica dentro e fora do laboratório, bem como para desenvolver as minhas competências sociais e humanas. Estive um mês em cada uma destas valências, à excepção da hematologia, na qual estive dois meses.

Neste relatório é realizada uma abordagem teórica e prática das áreas da Hematologia e da Microbiologia, que se debruça essencialmente nas metodologias utilizadas, bem como todo o processamento de amostras e validação dos resultados. É feita ainda uma descrição sucinta da Bioquímica e Imunologia bem como da fase pré analítica e do controlo de qualidade. No final do relatório encontra-se a discussão de alguns casos clínicos que foram surgindo ao longo destes seis meses de estágio.

2. Caracterização do laboratório

O Laboratório de Análises Clínicas SYNLAB Madeira situa-se no Hospital Particular da Madeira (HPM) e dispõe vários postos de colheitas distribuídos por toda Ilha. Para além do serviço hospitalar e do serviço à comunidade local, possui acordos com várias entidades como empresas de medicina de trabalho, clínicas, lares e centros de hemodiálise. O laboratório tem em média 200 utentes por dia.

A Direcção Técnica do laboratório encontra-se a cargo da Doutora Susana Agostinho, Farmacêutica Especialista em Análises Clínicas, e a restante equipa é constituída por Técnicos Auxiliares e Administrativos, Técnicos de Análises Clínicas e Técnicos Superiores de Saúde.

Na unidade central do laboratório são realizadas análises nas áreas de Hematologia, Bioquímica, Imunologia, Endocrinologia e Microbiologia.

As infraestruturas do LACSM abrangem salas de espera, gabinetes administrativos e gabinetes técnicos, salas de reuniões, salas de colheitas, um armazém, uma câmara de frio e os espaços das diferentes áreas laboratoriais.

2.1. Fase pré-analítica

A fase pré-analítica compreende todo o processo que antecede a análise da amostra: requisição, preparação do doente, colheita, triagem, acondicionamento e transporte. Estas etapas, além de não serem automatizadas, envolvem vários locais e profissionais com diferentes formações, daí a maior susceptibilidade à ocorrência de erros.

O processo começa no momento da requisição. Na requisição consta os parâmetros que foram solicitados e, ocasionalmente, observações sucintas acerca da situação clínica do doente, nas quais o seu conhecimento pode dar alguma utilidade ao laboratório. O doente, nesse momento, é devidamente informado e sensibilizado das condições na qual deve fazer a colheita.

No dia da colheita, é entregue ao enfermeiro ou técnico os produtos biológicos passíveis de serem colhidos pelo utente – urina e fezes – e ainda antes de proceder a colheita, o enfermeiro certifica-se que o doente cumpriu todas as condições para a mesma e realiza algumas questões relativamente à terapêutica. Posto isto, segue-se a colheita propriamente dita. A colheita de sangue venoso deve seguir uma ordem específica: citrato de sódio, gel separador, heparina, EDTA e fluoreto. A cor da tampa de cada um destes tubos é representativo do aditivo que lhe constitui. À cada tubo é atribuído uma etiqueta onde consta um código alfa numérico que identifica o posto de colheita, o doente e a natureza da amostra; e um código de barras onde integra todo o processo e que vai ser lido nos analisadores. Os tubos são centrifugados e, posteriormente, transportados para o laboratório.

As amostras oriundas do próprio hospital, chegam ao laboratório devidamente acondicionadas através do correio pneumático, ao passo que as restantes amostras provenientes de postos de colheitas chegam em malas térmicas, através dos estafetas. À chegada do laboratório é medida a temperatura das malas e a mesma é registada numa folha de controlo, na qual também se regista a data e hora que se recebeu a amostra, bem como o nome do estafeta que fez a entrega e a assinatura de quem a recebeu. Uma vez no laboratório, segue-se a triagem das amostras.

Na triagem, faz-se a integração dos processos que não estavam integrados, analisa-se a qualidade e as faltas de produto e dá-se entrada dos mesmos a partir do programa *Appollo*. Este programa informático harmoniza toda a informação necessária acerca das colheitas, como também de todas as condições de processamento e armazenamento de amostras. Assim que é dada a entrada dos produtos, estes são distribuídos pelas valências ou então separados em alíquotas para serem enviadas para o exterior, nas situações em que o laboratório não

disponha as metodologias necessárias para determinar os parâmetros requeridos. Para esses casos, o LACSM conta com o apoio do Laboratório Macedo Dias no Porto, Laboratório Santa Isabel em Lisboa e também com o Laboratório de Barcelona. As amostras são enviadas de segunda à quinta, e por isso é tido em conta a estabilidade das amostras antes de sequer serem enviadas.

2.2. Fase analítica

A fase analítica abrange todo o processamento das amostras que se inicia, assim que se tenha realizado a manutenção diária dos analisadores e aceite todos os controlos. Nesta fase, o conhecimento das metodologias e do funcionamento dos analisadores é fundamental para a obtenção de resultados verossímeis. Desta forma, na **Tabela I** consta todos os analisadores que o LACSM dispõe para o processamento das amostras, bem como as suas metodologias.

Tabela I- Analisadores utilizados no LACSM e as suas respectivas metodologias.

Área	Analisador	Metodologia
Bioquímica	ADVIA® 1800 Clinical Chemistry	Potenciometria, espectrofotometria, turbidimetria
	Roche® cobas e 411 analyzer	Quimioluminescência
	Adams AIC HA-8160	HPLC
	Capillarys 2 SEBIA	Electroforese capilar
	Aution-Max AX-4280	Espectrofotometria de refletância
	Spotlyte	Potenciometria
Imunologia	Siemens Advia Centaur XP	Quimioluminescência
	Siemens Advia Centaur CP	Quimioluminescência
	VIDAS	Fluoroenzimático
Microbiologia	VITEK® 2 COMPACT	Fluorescência, turbidimetria
	BACT/ALERT®	Colorimetria
	GeneXpert®	PCR
Hematologia	VES-Matic cube 30	Westergren
	Sysmex CA-500	Detecção foto-óptica
	Sysmex XN-550	Impedância, citometria de fluxo, espectrofotometria

2.3. Fase pós analítica

A fase pós-analítica constitui todos os processos que se seguem aos exames laboratoriais: a validação analítica realizada pelo técnico bem como a validação biopatológica efectuada pelo especialista; a eliminação e armazenamento de amostras e a transmissão dos resultados aos clínicos ou utentes.

A validação analítica consiste em validar os resultados obtidos pelos analisadores de acordo com as metodologias implementadas no mesmo. Ao passo que a validação biopatológica correlaciona os resultados obtidos de todas as valências com a clínica do doente.

As amostras são armazenadas de acordo com as condições estipuladas no manual de colheitas integrado no sistema. A arrumação e a eliminação das amostras é informatizada de forma a agilizar a procura dos tubos.

Os resíduos perigosos e não perigosos são eliminados de acordo com o Despacho nº 242/96 do Ministério da Saúde, a fim de evitar a disseminação de microrganismos e não constituir um risco para a população. (Direção-Geral de Saúde, 2011)

3. Controlo de qualidade

O LACSM implementou o Controlo de Qualidade Interno (CQI) e a Avaliação Externa de Qualidade (AEQ) como meio de assegurar resultados precisos e exactos, que permitam ao médico a obtenção de dados fidedignos que lhe auxiliem no diagnóstico. Para além da monitorização da execução analítica, estende estes procedimentos de controlo à fase pré-analítica e pós analítica.

3.1. Controlo de Qualidade Interno

Na fase pré-analítica, como já foi dito anteriormente, as etapas além de não serem automatizadas, envolvem vários locais e profissionais com diferentes formações. Assim, o controlo de qualidade nesta fase resume-se em manter os manuais de colheitas devidamente actualizados, verificar as análises requisitadas e fazer o seguimento de indicadores desta fase, nomeadamente: erros de inscrição/inscrições alteradas; repetições da colheita e erros de triagem.

Na fase analítica é feito o CQI de acordo com o Manual de Boas Práticas Laboratoriais. Este controlo consiste em avaliar a precisão e reprodutibilidade dos ensaios clínicos através da média, desvio padrão e coeficiente de variação. Para tal, é feito a corrida de amostras

controlo, a fim de obter-se o gráfico de Levey-Jennings que é interpretado segundo as regras de Westgard. A periodicidade da corrida do controlo varia consoante o método analítico e o aparelho em causa. Em todos os analisadores utiliza-se no mínimo dois níveis de concentração de amostra controlo, no qual um nível representa a concentração do analito em condições fisiológicas e o outro em condições patológicas. A análise das cartas de controlo consiste em verificar se alguma das regras de Westgard foi infringida e identificar a natureza do erro, se é aleatório ou sistemático. Seguidamente, é determinada a origem da não conformidade e são tomadas acções correctivas, entre elas: a calibração do reagente com calibradores próprios, substituição do reagente, lavagem do aparelho, etc. Repete-se o controlo com uma nova alíquota e se este estiver conforme as regras de Westgard, é aceite e pode iniciar-se o processamento das amostras dos utentes. Por outro lado, se o erro persistir depois de terem sido tomadas todas as acções correctivas, entra-se em contacto com o fabricante e reporta-se o erro.

Os lotes da amostra controlo apresentam valores diferentes do analito em estudo, e por isso, é necessário elaborar uma nova carta de controlo sempre que se inicie um novo lote. Para tal, deve-se introduzir os valores tabelados e descritos nas bulas dos controlos.

A ocorrência de erros na fase pós-analítica é diminuta e deve-se essencialmente à lapsos na transcrição dos resultados. Por isso, a própria validação analítica e a validação biopatológica são meios de assegurar a qualidade nesta fase. Para além disso, faz-se o seguimento de indicadores da fase pós-analítica como o tempo de entrega dos resultados e reclamações que possam surgir acerca da apresentação dos resultados.

3.2. Avaliação Externa de Qualidade

Periodicamente, chegam ao laboratório amostras fornecidas pela entidade de qualidade externa. Estas amostras são desconhecidas e são processadas normalmente, como se de uma amostra de um doente se tratasse. Os resultados são reportados à entidade responsável que os analisa e envia um relatório de avaliação. Nesse relatório é possível avaliar a exactidão dos nossos resultados, bem como compará-los com os dos outros laboratórios que participaram no programa. A comparação é feita entre os participantes que usaram o mesmo método ou analisador, ou os dois simultaneamente.

O LACSM participa em vários programas de avaliação externa: SEQC - *Sociedad Española de Medicina de Laboratorio*, RIQAS - *Randox International Quality Assessment Scheme*, Oneworld Accuracy, PNAEQ - *Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade*, SEHH -

4. Hematologia

A hematologia estuda a concentração, estrutura e função das células sanguíneas e dos seus precursores na medula óssea, bem como a função das plaquetas e proteínas envolvidas na coagulação. Esta valência integra ainda a análise dos constituintes do plasma ou soro que estão intimamente ligados à estrutura e função das células sanguíneas.

Nesta valência participei activamente na manutenção diária dos analisadores bem como na execução dos controlos internos. Ainda realizei e observei vários esfregaços de sangue periférico ao microscópio, e estive igualmente envolvida na validação analítica onde pude ministrar os conhecimentos teóricos adquiridos no decurso deste mestrado. Desta forma, será realizada uma abordagem teórica e prática das metodologias e parâmetros que o LACSM dispõe para a determinação dos parâmetros nesta área.

4.1. Hematopoiese

A hematopoiese define-se como o processo no qual ocorre a formação e desenvolvimento das diferentes populações de células sanguíneas. A medula óssea é o local hematopoiético mais importante a partir dos sete meses de vida fetal. Na fase adulta, apenas a medula dos ossos chatos constitui um local propício para que ocorra a hematopoiese, uma vez que ao longo da nossa vida há substituição progressiva da medula dos ossos longos por gordura. (Hoffbrand & Moss, 2018)

O processo hematopoiético está dependente de vários factores de crescimento, cuja fonte principal são as células do estroma – células endoteliais, fibroblastos, adipócitos - que juntamente com uma matriz extracelular composta por colagénio e moléculas de adesão, vão constituir um microambiente adequado para que a hematopoiese ocorra na medula. (Ghiaur & Jones, 2019)

A hematopoiese parte de uma célula estaminal pluripotente que tanto pode autorrenovar-se como diferenciar-se numa célula multipotente. Esta célula multipotente, por sua vez, diferencia-se em células precursoras da linha mielóide e em células precursoras da linha linfóide (**Figura 1**). A linha mielóide leva a formação de granulócitos - neutrófilos, eosinófilos e basófilos – mas também de monócitos, eritrócitos e megacariócitos. Estes

últimos, por sua vez, vão originar as plaquetas a partir da fragmentação do seu citoplasma. A linha linfóide, como o próprio nome assim o sugere, é responsável pela formação dos linfócitos T, B e *Natural Killer*. (Mirza, 2020)

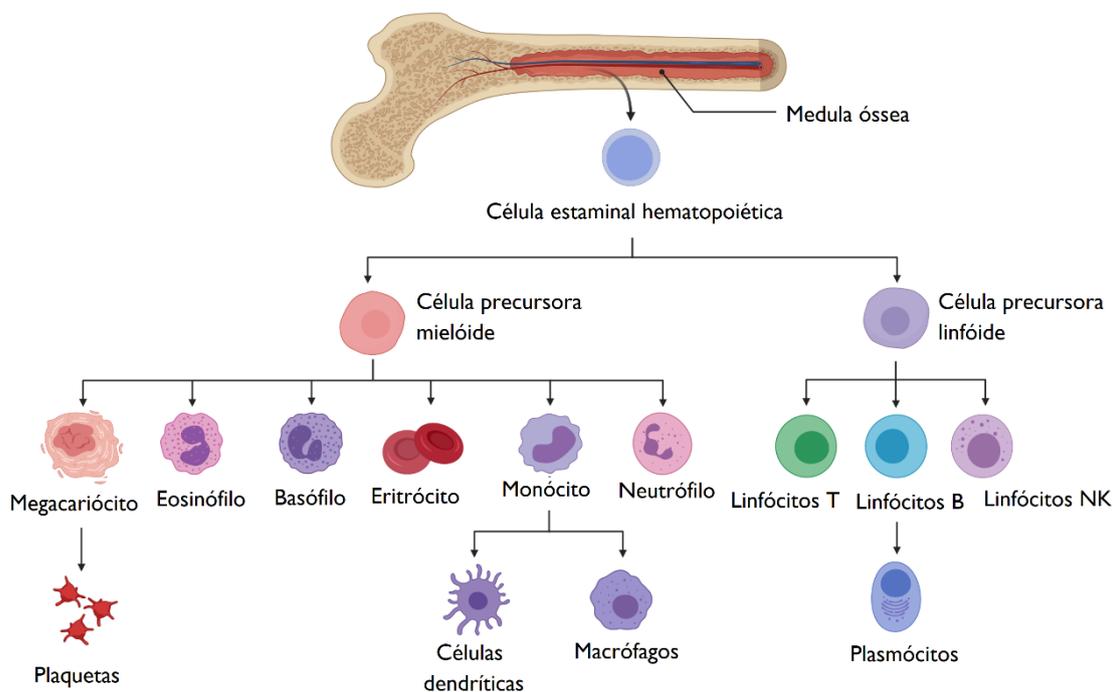


Figura 1 - Hematopoiese. As células estaminais hematopoiéticas originam as linhas celulares que produzem os elementos figurados do sangue. (Grants, et al., 2020)

4.2. Hemograma

A partir do hemograma obtém-se o eritrograma, o leucograma e o plaquetograma, permitindo-nos avaliar, respectivamente, a série eritrocitária, branca e plaquetária. O hemograma apresenta-se como uma ferramenta de excelência no diagnóstico e monitorização de doenças hematológicas, na detecção de quadros infecciosos e na monitorização da terapêutica.

No LACSM, todos os parâmetros que constituem o hemograma são obtidos a partir do analisador Sysmex XN-550. Este permite-nos quantificar e caracterizar as diferentes populações de células sanguíneas por mecanismos de impedância eléctrica e dispersão da luz. Os valores de referência variam com a idade, sexo e etnia do doente. A amostra utilizada é o sangue total e o anticoagulante predilecto é o EDTA K3. Esta escolha assenta no facto do EDTA ser um agente quelante de iões divalentes e conseguir ligar-se de forma irreversível ao cálcio, impedindo a coagulação e a agregação plaquetária. (Banfi, Salvagno, & Lippi, 2007)

4.2.1. Eritrograma

O eritrograma integra parâmetros como a contagem de eritrócitos (RBC), a concentração de hemoglobina (Hb), o hematócrito (HTC), o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Determina-se também o índice de distribuição do tamanho dos eritrócitos (RDW) e, ocasionalmente, pode ser requisitada a contagem de reticulócitos.

A contagem de eritrócitos e reticulócitos bem como a concentração da hemoglobina, são determinados por impedância eléctrica, citometria de fluxo e espectrofotometria, respectivamente. Os restantes parâmetros que constituem o eritrograma são obtidos por cálculo a partir dos parâmetros determinados.

a. Contagem de eritrócitos

Este parâmetro é um indicador da produção e tempo de meia vida dos eritrócitos, tem pouco interesse quando avaliado de forma isolada.

A contagem de eritrócitos baseia-se no método de impedância eléctrica, que assenta no facto das células assumirem-se como más condutoras de energia eléctrica. Assim, detecta-se e mede-se a alteração da corrente eléctrica induzida pela passagem de células num orifício entre dois eléctrodos. Este orifício tem o diâmetro predefinido ao tipo de células que se deseja contar e designa-se por zona de detecção. A cada célula que passa nesta zona de detecção, gera-se um pulso com uma determinada altura. Desta forma, o número de pulsos corresponderá ao número de eritrócitos e a altura do pulso ao volume. A focagem hidrodinâmica, que consiste na aplicação de um fluxo constante de diluente na zona de abertura, é o que vai garantir que cada célula passe individualmente uma única vez na zona de detecção, evitando assim contagens repetidas e erradas. (Bain & Briggs, 2017) Ainda assim, a presença de plaquetas muito grandes ou glóbulos vermelhos muito pequenos podem interferir na contagem, daí a importância de atender os alarmes emitidos pelo sistema e observar o histograma de distribuição de tamanho e volume dos eritrócitos ou das plaquetas.

b. Concentração de hemoglobina

A concentração de hemoglobina é determinada por espectrofotometria. Numa primeira fase é adicionado um composto surfactante – Lauril Sulfato de Sódio (SLS) – que desencadeia a lise dos glóbulos vermelhos e, por conseguinte, a libertação da hemoglobina. Posteriormente, as cadeias da molécula de hemoglobina interagem com os grupos alquilo hidrofílicos do SLS, induzindo a conversão da hemoglobina do estado ferroso para o estado férrico com a subsequente formação de meta-hemoglobina. Por fim, esta liga-se ao composto SLS e forma um complexo corado que absorve radiação a 555 nm e que pela lei de Lambert - Beer consegue-se obter a concentração da hemoglobina, expressa em g/dL. (Silva, et al., 2016) Os valores elevados de hemoglobina podem estar associados a pessoas com policitemia vera ou desidratação, ao passo que valores diminuídos se encontram em pessoas anémicas. (Vajpayee, Graham, & Bem, 2017)

c. Hematócrito

Representa a percentagem de volume ocupado pelos eritrócitos no volume de sangue total. O valor do hematócrito é gerado pelas alturas dos pulsos cumulativos de todos os eritrócitos, detectadas por impedância eléctrica. Pode estar aumentado na policitemia vera, mas também na desidratação ou no uso exuberado de antidiuréticos. (Vajpayee, Graham, & Bem, 2017)

d. Índices Eritrocitários

A determinação dos índices eritrocitários permite uma avaliação do tamanho, quantidade e concentração da hemoglobina no eritrócito, sendo particularmente útil para a caracterização e classificação de anemias. Os índices eritrocitários são obtidos a partir dos valores previamente determinados e encontram-se descritos na **Tabela II**.

e. Contagem de reticulócitos

Os reticulócitos são os precursores dos eritrócitos e correspondem aos eritrócitos imaturos que estão na corrente sanguínea. Permite-nos avaliar a eritropoiese, e, portanto, assume-se como uma ferramenta útil para discriminar anemias hipoproliferativas das anemias hiperproliferativas.

O analisador Sysmex XN-550 determina a contagem de reticulócitos a partir de citometria de fluxo onde é utilizado um corante fluorescente – a polimetina – que se liga aos

ácidos nucleicos. Além de contar, é possível discriminar os reticulócitos em três populações distintas de acordo com o seu conteúdo em RNA: reticulócitos de elevada (HFR), média (MFR) e baixa dispersão (LFR), sendo que os de elevada dispersão correspondem aos reticulócitos mais imaturos que emitem maior fluorescência. (Briggs, 2009) É ainda possível obter índices reticulocitários referentes ao tamanho e ao conteúdo de hemoglobina (Ret – He) que reflecte a síntese de hemoglobina nos precursores eritróides da medula óssea. Este parâmetro, sendo altamente sensível, pode ser uma mais valia para avaliar a deficiência de ferro numa fase mais precoce, mesmo antes de evoluir para a anemia. (Runggu, Wahani, & Mantik, 2016)

Tabela II- Índices eritrocitários e o seu interesse clínico. (Briggs, C. & Bain, B. J., 2017)

Parâmetro	Cálculo	Comentário
VCM	$\frac{\text{HCT}}{\text{RBC}} \times 10$	Representa o volume médio de cada eritrócito (fL). Classifica as anemias como microcíticas para VCM < 80 fL, normocíticas para VCM entre 80 e 100 fL e macrocíticas para VCM >100 fL.
HCM	$\frac{\text{Hb}}{\text{RBC}} \times 10$	É o conteúdo médio de hemoglobina por eritrócito (pg). Os valores normais estão entre os 27-32 pg. Não se utiliza este parâmetro para classificar as anemias.
CHCM	$\frac{\text{Hb}}{\text{HCT}} \times 100$	É a concentração média de hemoglobina por eritrócito (g/dL). Classifica as anemias como hipocrómicas para CHCM < 32 f/dL ou normocrómicas CHCM entre 32 e 36 g/dL. Uma maior concentração de hemoglobina irá reflectir um maior volume de eritrócito, comumente observado na esferocitose.
RDW	RDW-SD (fL) RDW-CV (%)	Representa a heterogeneidade do volume dos eritrócitos presentes na amostra e é particularmente útil no diagnóstico diferencial de anemias microcíticas.

4.2.2. Leucograma

A avaliação da série leucocitária integra a contagem total de leucócitos, expressa em número de células por litro de sangue; e a contagem diferencial em números absolutos e percentuais de cada uma das seguintes populações leucocitárias: neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos. Qualquer uma destas determinações se baseia no método de citometria de fluxo.

Na citometria de fluxo, as células passam uma a uma diante uma fonte de luz laser e vão dispersar essa luz em diferentes ângulos de acordo com as suas propriedades físicas. A dispersão da luz frontal, dá-nos indicações acerca do tamanho da célula e a dispersão da luz lateral, permite-nos saber o grau de complexidade da célula, que na verdade refere-se à granularidade do citoplasma da mesma. É ainda possível avaliar as células quanto ao seu teor em ácidos nucleicos pela emissão de fluorescência. (Bain & Briggs, 2017) Quer na contagem total de leucócitos quer na contagem diferencial é necessário que, num primeiro momento, se adicione o reagente Lysercell que vai induzir a lise dos eritrócitos de forma a não interferirem na contagem das células brancas. Além disso, este reagente vai sensibilizar a membrana dos leucócitos, de modo a permitir a entrada do fluoróforo polimetina na célula para posteriormente ligar-se aos ácidos nucleicos.

Os promielócitos, mielócitos e metamielócitos estão incluídos na contagem de granulócitos imaturos apesar de não ser possível identificá-los individualmente. A presença de granulócitos imaturos está associada à *sepsis*, infecções bacterianas, estados inflamatórios, cancro ou doenças mieloproliferativas. (Briggs, 2009)

4.2.3. Plaquetograma

A avaliação da série plaquetária é efectuada através do plaquetograma que integra a contagem de plaquetas, o volume plaquetário médio, o plaquetócrito, o índice de distribuição do tamanho plaquetário e o rácio de plaquetas gigantes.

A contagem de plaquetas é dada em número de células por litro de sangue e mostra-se útil no rastreio e diagnóstico de distúrbios hemostáticos. No analisador Sysmex XN- 550, esta contagem é efectuada no mesmo canal que a contagem de eritrócitos e segue a mesma metodologia de impedância eléctrica. Um valor mínimo é determinado para separar as plaquetas de restos celulares ou do ruído do sinal, bem como é definido um valor máximo para separar as plaquetas das hemácias. Assim, uma contagem baixa de plaquetas nem sempre corresponde a uma verdadeira trombocitopenia. Estima-se que cerca de 15%-30% dos casos

de trombocitopenia observados na rotina laboratorial correspondem a pseudotrombocitopenias. (Costa, et al., 2020) Estas pseudotrombocitopenias podem advir de plaquetas gigantes que foram identificadas como hemácias, ou em fenómenos de satelitismo. (Briggs, 2009)

O volume plaquetário médio (VPM) representa o volume médio de cada plaqueta, expresso em fentolitros (fL). Há, efectivamente, uma relação inversa entre o VPM e o número de plaquetas. Quando o número de plaquetas está diminuído, os megacariócitos são estimulados pela trombopoietina a produzir plaquetas maiores. (Briggs, 2009) As plaquetas maiores são enzimática e metabolicamente mais activas. Para além de possuírem maior número de grânulos, expressam maior número de receptores IIb/IIIa e conseguem agregar mais rapidamente, o que reflecte um potencial trombótico maior. (Khandekar, et al., 2006) Assim, valores elevados do VPM estão frequentemente associados a trombocitopenias periféricas como a púrpura trombocitopénica auto-imune e a coagulação intravascular disseminada. (Briggs, 2009)

O índice de distribuição do tamanho plaquetário (PDW) refere-se à heterogeneidade do volume das plaquetas em fL. O plaquetócrito (PCT) representa o volume ocupado pelas plaquetas no volume de sangue total expresso em percentagem e é calculado através dos índices plaquetários acima referidos, o que pressupõe que alguma alteração nesses valores proporcione uma variação no PCT. Por fim, o rácio de plaquetas gigantes (P-LCR) apresenta-se como a percentagem de plaquetas com valores de VPM superior a 12 fL. Estes valores elevados estão associados a presença de plaquetas gigantes em casos de destruição imune, bem como de agregados plaquetários em casos de pseudotrombocitopenia. (Briggs, 2009)

4.3. Esfregaço Sanguíneo

O estudo morfológico do sangue periférico é efectuado quando requisitado e deve ser considerado perante um hemograma alterado, contanto que o histórico e a situação clínica do doente o justifiquem. Através da observação do esfregaço são avaliadas as contagens automáticas e a morfologia de todas as linhagens sanguíneas.

No LACSM, os esfregaços são preparados manualmente (**Anexo I**) a partir de amostras de sangue total em EDTA K3 e corados pelo *kit* Hemacolor[®] que segue o método de Pappenheim. Nesta coloração, o azul de metileno, que é um corante básico, confere uma cor azul-violeta aos componentes acídicos da célula – ácidos nucleicos, nucleoproteínas e grânulos de basófilos, neutrófilos e plaquetas – e o corante eosina, que é um corante ácido, confere uma cor vermelha aos constituintes celulares básicos como os grânulos de eosinófilos

e a hemoglobina. (Bain, 2016) Neste *kit*, a solução tampão de pH 7.2 assegura a estabilidade da coloração e resultados livres de precipitação.

No microscópio óptico começa-se por observar o esfregaço sanguíneo com a objectiva de 10× e avalia-se a qualidade do esfregaço e da coloração. Ainda com esta objectiva, observa-se a presença de eritrócitos aglutinados ou em *rouleaux*, bem como a presença de agregados plaquetários e células grandes e anormais, nomeadamente blastos, linfócitos reactivos e parasitas. Na ampliação de 40× escolhe-se o melhor campo para realizar a contagem diferencial dos leucócitos e que, em regra, corresponde a área onde os eritrócitos não se encontram sobrepostos. Nesta ampliação já é possível realizar uma boa avaliação da distribuição de tamanho, forma e cor das células hematológicas. Por fim, com a objectiva de 100× e em óleo de imersão, faz-se a contagem diferencial de leucócitos, na qual contam-se 100 leucócitos consecutivos. (Bain & Briggs, 2017)

4.3.1. Avaliação da série eritrocitária

As células da série eritrocitária podem apresentar alterações na cor, tamanho, forma, distribuição e inclusões. Estas alterações morfológicas surgem na sequência de uma eritropoiese ineficaz ou acelerada como resposta da medula em compensar uma anemia; bem como de uma síntese inadequada de hemoglobina ou de outros danos que possam ter surgido depois do eritrócito abandonar a medula. (Bain & Briggs, 2017)

Em populações dimórficas, onde é bem evidente a presença de duas populações com tamanhos ou cores diferentes, deve-se considerar as duas populações e adicionar nas observações a avaliação das mesmas. Aplica-se sobretudo às pessoas que se submeteram às transfusões sanguíneas ou tratamentos onde há reposição hematológica, e sugere-nos que foram bem-sucedidas.

a. Cor

Normalmente, os eritrócitos assumem uma forma bicôncava e por isso, apresentam uma palidez no seu centro que ocupa cerca de um terço do seu diâmetro. Quando esta palidez central ocupa uma área maior, o eritrócito encontra-se hipocrómico (**Figura 2A**). (Butina, 2020) Esta hipocromia deve-se essencialmente à uma síntese inadequada de hemoglobina, como resultado da falha da síntese do grupo heme e por isso, é observada em anemias de deficiência de ferro e sideroblásticas e na inflamação crónica. A hipocromia pode também advir

de falhas na síntese de globina e, por conseguinte, observar-se nas talassémias. (Bain & Briggs, 2017)

Em situações onde há aumento da actividade da medula óssea, é possível observar-se policromasia (**Figura 2B**) que se deve à presença de formas mais imaturas dos eritrócitos, e por apresentarem algum RNA residual adquirem uma tonalidade azul acinzentada. (Butina, 2020)

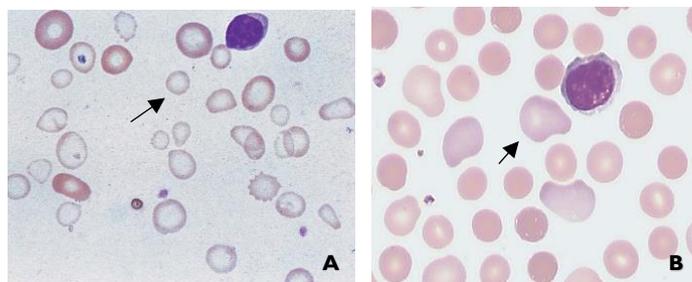


Figura 2 - Índices eritrocitários e o seu interesse clínico. A) Eritrócito hipocrômico; B) Policromasia. (Adaptado de Bain, 2017).

b. Tamanho

Em condições fisiológicas, o tamanho de um eritrócito é relativamente próximo ao tamanho do núcleo de um linfócito. Podem ser macrocíticos (**Figura 3A**) se apresentarem um diâmetro superior, ou microcíticos (**Figura 3B**) se forem menores. A macrocitose está associada às hepatopatias, anemias megaloblásticas, deficiência de vitamina B12 e/ou folato bem como à anemia aplásica. Ainda que fisiológica, também se observa eritrócitos macrocíticos em recém-nascidos. Já a microcitose encontra-se frequentemente nas anemias por deficiência de ferro, sideroblásticas, talassémias, intoxicação por chumbo, hemoglobinopatias e, ocasionalmente, nas anemias de doenças crónicas. A heterogeneidade no tamanho celular designa-se por anisocitose. (Butina, 2020)

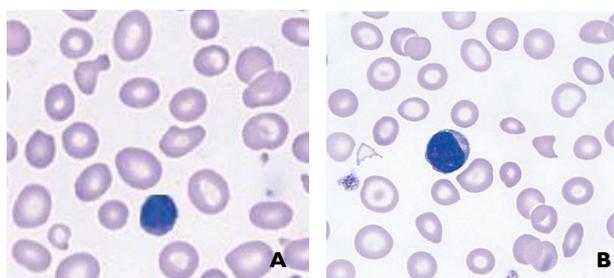
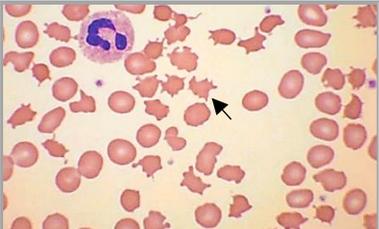
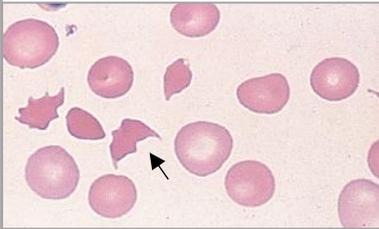
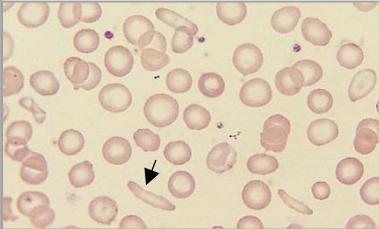
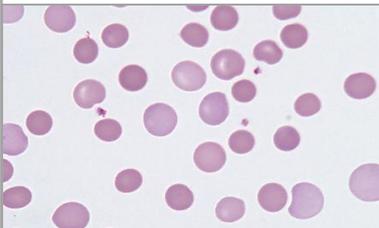
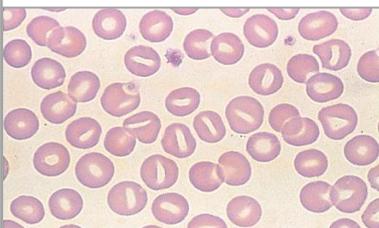
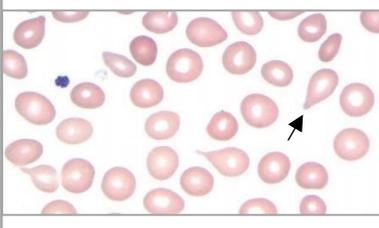


Figura 3 - Eritrócitos ao lado de um linfócito. A) Macrocitose; B) Microcitose (Adaptado de Keohane et al., 2020).

c. Forma

As diferentes formas que o eritrócito pode assumir define-se como poiquilocitose. Os poiquilócitos têm denominações diferentes e podem constituir uma ferramenta útil para identificar a etiologia da alteração. Na **Figura 4** encontram-se descritos alguns exemplos dos poiquilócitos mais comuns na rotina laboratorial com a respectiva associação clínica.

	<p>Acantócitos:</p> <p>Têm espículas de comprimentos diferentes distribuídas de modo irregular sobre a superfície. Observa-se nas abetalipoproteinemias hereditárias.</p> <p>Adaptado de Bain, 2015</p>
	<p>Esquizócitos</p> <p>São fragmentos de eritrócitos e assumem tamanho e forma variável. Observa-se nas anemias microangiopáticas e nas queimaduras graves.</p> <p>Adaptado de Keohane et al., 2020</p>
	<p>Eliptócitos</p> <p>Assumem forma de charuto, oval ou elíptica. Observa-se em anemias microcíticas e megaloblásticas bem como nas síndromes mieloproliferativas e na deficiência de piruvato cinase.</p> <p>Adaptado de Bain, 2015</p>
	<p>Esferócitos</p> <p>São pequenos, redondos e densos sem palidez central. Verifica-se na esferocitose hereditária e anemias hemolíticas auto-imune.</p> <p>Adaptado de Keohane et al., 2020</p>
	<p>Estomatócitos</p> <p>Apresentam uma fenda central. Frequentemente observadas em casos de alcoolismo, hepatopatia, anemia hemolítica auto-imune.</p> <p>Adaptado de Keohane et al., 2020</p>
	<p>Dacriócitos</p> <p>Célula em forma de lágrima. São característicos da anemia megaloblástica, da talassemia maior e da mielofibrose.</p> <p>Adaptado de Keohane et al., 2020</p>

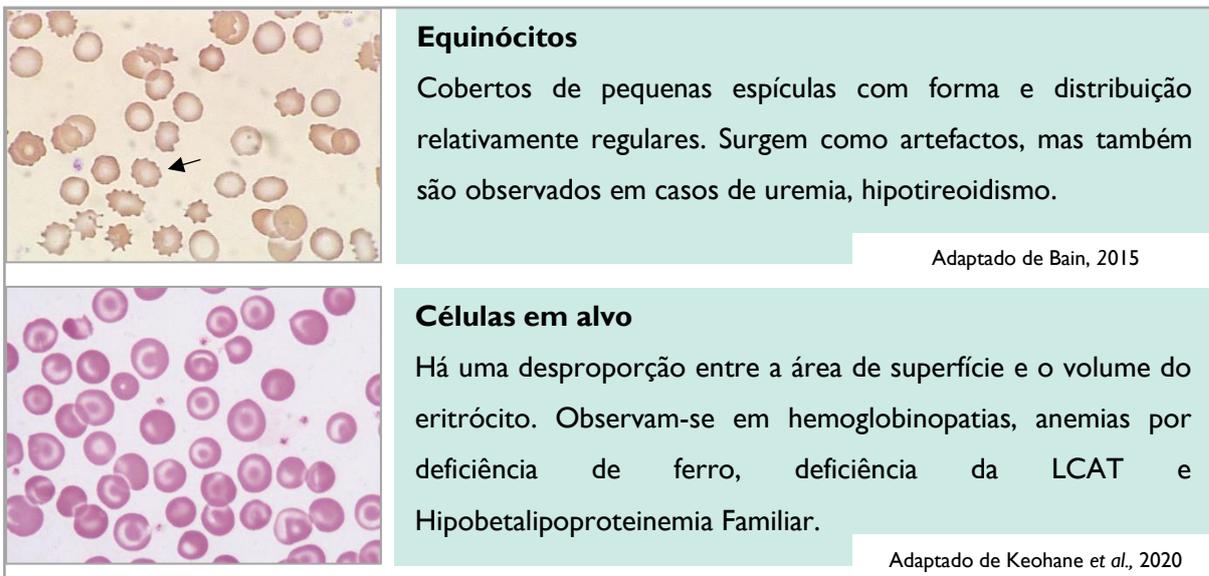


Figura 4 - Alguns exemplos de poiquilócitos com a respectiva associação clínica (Adaptado de Keohane et al., 2020; Bain, 2015).

d. Distribuição

No esfregaço pode-se detectar a formação de *rouleaux* e a aglutinação dos eritrócitos. O *rouleaux* é o empilhamento dos eritrócitos na zona mais fina do esfregaço sanguíneo periférico como se encontra ilustrado na **Figura 5A**. Ocorrem devido à perda da carga negativa na superfície dos eritrócitos, provocada pelo excesso de proteínas plasmáticas. Assim, encontram-se em quadros onde há aumento das proteínas no plasma, tais como: gravidez, processos inflamatórios e mieloma múltiplo. Todavia, este fenómeno também pode ser encontrado nas zonas mais espessas dos esfregaços sanguíneos, e nesses casos não têm qualquer relevância clínica. Relativamente à aglutinação eritrocitária (**Figura 5B**), esta é formada por agregados de eritrócitos resultantes da presença de hemaglutininas a frio. O anticorpo é uma IgM, e os agregados de eritrócitos geralmente se sobrepõem. Estas, tal como o próprio nome o sugere, podem actuar em quaisquer temperaturas abaixo de 37 °C. Posto isto, as amostras contendo aglutinação eritrocitária precisam de ser incubadas a 37°C/30min na estufa, antes de voltarem a ser analisadas, a fim de obter-se contagens fidedignas no hemograma. (Silva, et al., 2016)

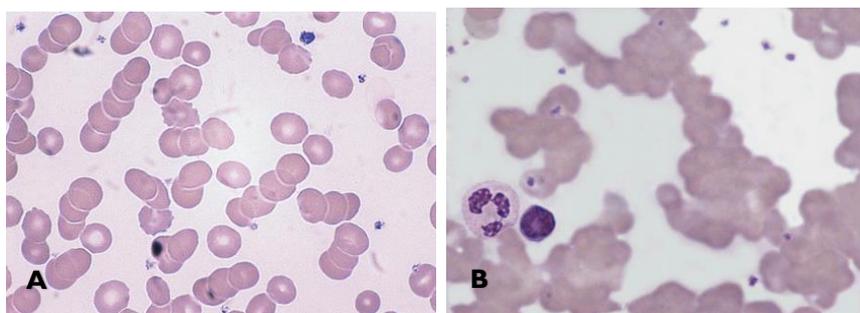


Figura 5 - Diferença entre aglutinação eritrocitária e rouleaux (Adaptado de Bain, 2017).

e. Inclusões

Em todo o meu estágio, apenas tive oportunidade de ver um tipo de inclusão eritrocitária, os corpos de Pappenheimer. Estes corpos estão associados às anemias sideroblásticas, anemias hemolíticas, intoxicação de metais e em pós-esplenectomia. Os grânulos são constituídos por ferro e por isso estas células também se denominam por siderócitos. No entanto, outras formas de inclusões podem ser observadas tais como: corpos de Holly-Jowell, parasitas e corpos de Heinz, sendo que neste último deve-se utilizar uma coloração específica com azul metileno de novo. (Bain & Briggs, 2017)

4.3.2. Avaliação da série leucocitária

Na rotina laboratorial, são os linfócitos e os neutrófilos as populações leucocitárias que mais sofrem alterações morfológicas. Algumas dessas alterações constituem um verdadeiro achado laboratorial. Na **Figura 6** encontra-se cada uma das cinco populações leucocitárias que aparecem normalmente no sangue periférico de um indivíduo saudável.

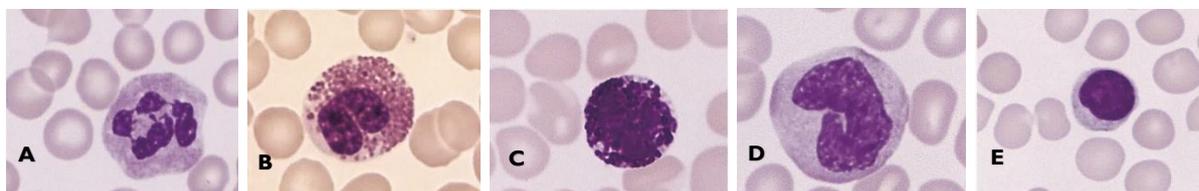


Figura 6 - Leucócitos que aparecem normalmente no sangue periférico. A) Neutrófilo; B) Eosinófilo; C) Basófilo; D) Monócitos; E) Linfócito (Adaptado de Hoffman e Moss, 2017).

A avaliação da série leucocitária integra a observação da morfologia e do número de leucócitos. Na **Tabela III** encontra-se representado as alterações numéricas dos leucócitos e as possíveis causas subjacentes.

Tabela III- Alterações numéricas e possíveis causas associadas. (AnnBonillaj & Menell, 2016)

Alteração	Significado	Causas
Neutrofilia	↑ Número de neutrófilos ($>7,5 \times 10^9/L$)	corticosteróides; infecções agudas; inflamação; leucemia mielóide crónica; queimaduras; gravidez.
Neutropenia	↓ Número de neutrófilos ($<2,5 \times 10^9/L$)	medicamentosa; leucemia mielóide aguda; infecção; doenças auto-imunes.
Eosinofilia	↑ Número de eosinófilos ($>0,4 \times 10^9/L$)	alergias; parasitoses; doenças auto-imunes.
Monocitose	↑ Número de monócitos ($>0,8 \times 10^9/L$)	artrite reumatóide; linfoma de Hodgkin; inflamação; infecções virais ou fúngicas.
Monocitopenia	↓ Número de monócitos ($<0,2 \times 10^9/L$)	supressão da medula óssea.
Basófilia	↑ Número de basófilos ($>0,1 \times 10^9/L$)	leucemia mielóide crónica; mielofibrose; policitemia vera; hipotiroidismo.
Linfocitose	↑ Número de linfócitos ($>11 \times 10^9/L$)	infecções virais.
Linfopénia	↓ Número de linfócitos ($>4 \times 10^9/L$)	HIV; uso de corticosteróides; falha renal; doenças crónicas.

A neutrofilia pode manifestar-se com diferentes características e algumas delas são particularmente úteis para identificar a sua etiologia. Nas infecções bacterianas e em reacções leucemóides é comum haver um desvio à esquerda e por isso, a maioria dos neutrófilos se apresentam hiposegmentados (**Figura 7A**). Por outro lado, em anemias megaloblásticas e infecções crónicas, há um desvio à direita e, portanto, os neutrófilos surgem comumente como hipersegmentados (**Figura 7B**). Outras alterações morfológicas menos comuns podem ocorrer, nomeadamente, neutrófilos com corpos de Döhle, observadas em casos de infecções bacterianas, gravidez, reacções leucemóides, queimaduras e uso de citotóxicos; neutrófilos com granulações tóxicas, associadas à algumas infecções bacterianas e estados inflamatórios;

ou neutrófilos com vacuolizações tóxicas. presentes na *sepsis* mas também na intoxicação por álcool e insuficiências hepáticas agudas. (Bain & Briggs, 2017)

No que diz respeito aos linfócitos, a alteração morfológica mais típica é, efectivamente, a do linfócito reactivo (**Figura 7C**) associado às infecções virais como a mononucleose infecciosa. Para além disso, é possível detectar as *smudge cells* (**Figura 7D**) que correspondem a restos celulares, geralmente de linfócitos mais fragilizados, e que são encontrados frequentemente na leucemia linfocítica crónica e na mononucleose infecciosa. Por fim, na avaliação da série leucocitária deve-se estar atento a quantidade de células precursoras – blastos – presentes no esfregaço sanguíneo periférico, já que uma quantidade elevada pode ser sugestivo de leucemia aguda. (Bain & Briggs, 2017)

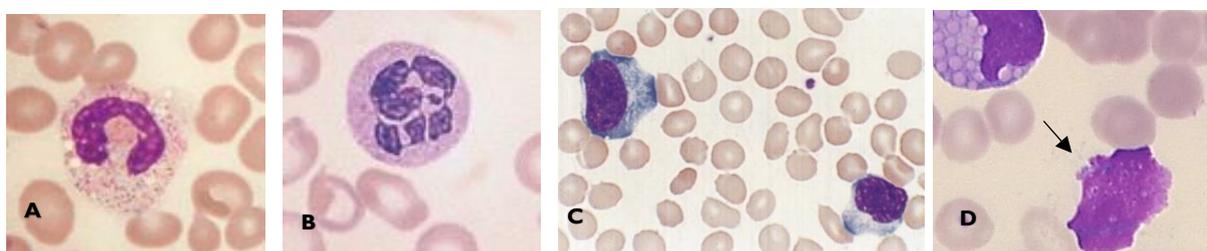


Figura 7 - Células brancas com morfologia alterada. A) Neutrófilo em banda; B) neutrófilo hipersegmentado; C) Linfócito reactivo; D) *Smuge cells* (Adaptado de Bain, 2017).

4.3.3. Avaliação da série plaquetária

Nas plaquetas, avalia-se o tamanho e a granularidade das mesmas. As pseudotrombocitopenias são dos principais motivos que nos leva a preparar um esfregaço sanguíneo no LACSM. Nas pseudotrombocitopenias observam-se agregados plaquetários (**Figura 8A**) e com menos frequência o satelitismo plaquetário (**Figura 8B**), que advêm da reacção induzida pelo EDTA. Os agregados plaquetários resultam de uma reacção mediada por autoanticorpos presentes no plasma contra a glicoproteína IIb/IIIa, que integra a superfície plaquetária (Fang, Chien, Yang, Lu, & Lin, 2015), ao passo que o satelitismo plaquetário é induzido por anticorpos IgG ou IgM, que faz as plaquetas aderirem ao receptor CD16 dos neutrófilos. (Bain, 2016) Ainda na série plaquetária, também é possível observar a presença de plaquetas gigantes que apresentam tamanhos próximos ao de um linfócito ou eritrócito, e que podem estar relacionados com a Síndrome de Bernard- Soulier. Ainda com menos frequência podem aparecer no esfregaço sanguíneo plaquetas cinzentas associadas à Síndrome das Plaquetas Cinzentas que decorrem na sequência de uma deficiência de α -grânulos ou de uma deficiência dupla de α e β -grânulos. (Bain, 2016)

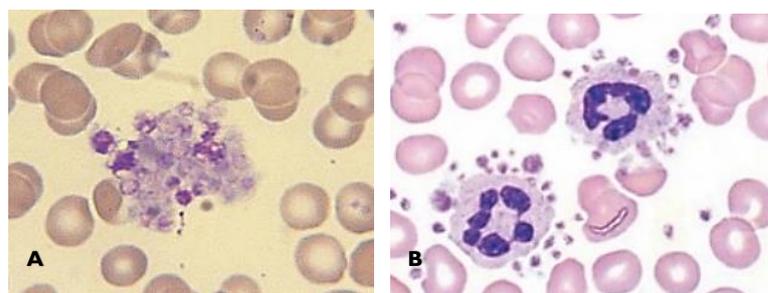


Figura 8 - Pseudotrombocitopenias no esfregaço sanguíneo periférico. A) Agregado plaquetário; B) Satelitismo plaquetário (Adaptado de Bain, 2015).

4.4. Hemostase

A hemostase é um mecanismo fisiológico que assegura a reparação e o restabelecimento das funções dos tecidos lesados. Neste processo intervêm plaquetas, células endoteliais, factores de coagulação, inibidores da coagulação e o sistema fibrinolítico. (Hoffbrand & Moss, 2017)

Na presença de uma lesão vascular, a resposta hemostática advém de três processos sequenciais: hemostase primária, coagulação e fibrinólise. Num primeiro momento ocorre a vasoconstrição, de modo a reduzir o fluxo sanguíneo da zona lesada e impedir a hemorragia. Paralelamente, o tecido lesado vai libertar substâncias pro-coagulantes, incluindo o factor tecidual que é, por excelência, o iniciador da cascata de coagulação. A cascata de coagulação integra a via intrínseca e a via extrínseca que culminam na via comum e encontra-se descrita na **Figura 9**. Por fim, ocorre a fibrinólise que assenta na dissolução do coágulo. Esta é catalisada por uma enzima denominada plasmina, que deriva da conversão do plasminogénio. Na sequência da fibrinólise, forma-se fragmentos denominados D-dímeros, que são posteriormente eliminados do organismo. (Laffan & Manning, 2017)

Para o estudo da hemostase, usa-se o plasma obtido a partir de um tubo de citrato de sódio, uma vez que o seu efeito anticoagulante é revertido pela adição de cálcio ao plasma. (Vajpayee, Graham, & Bem, 2017)

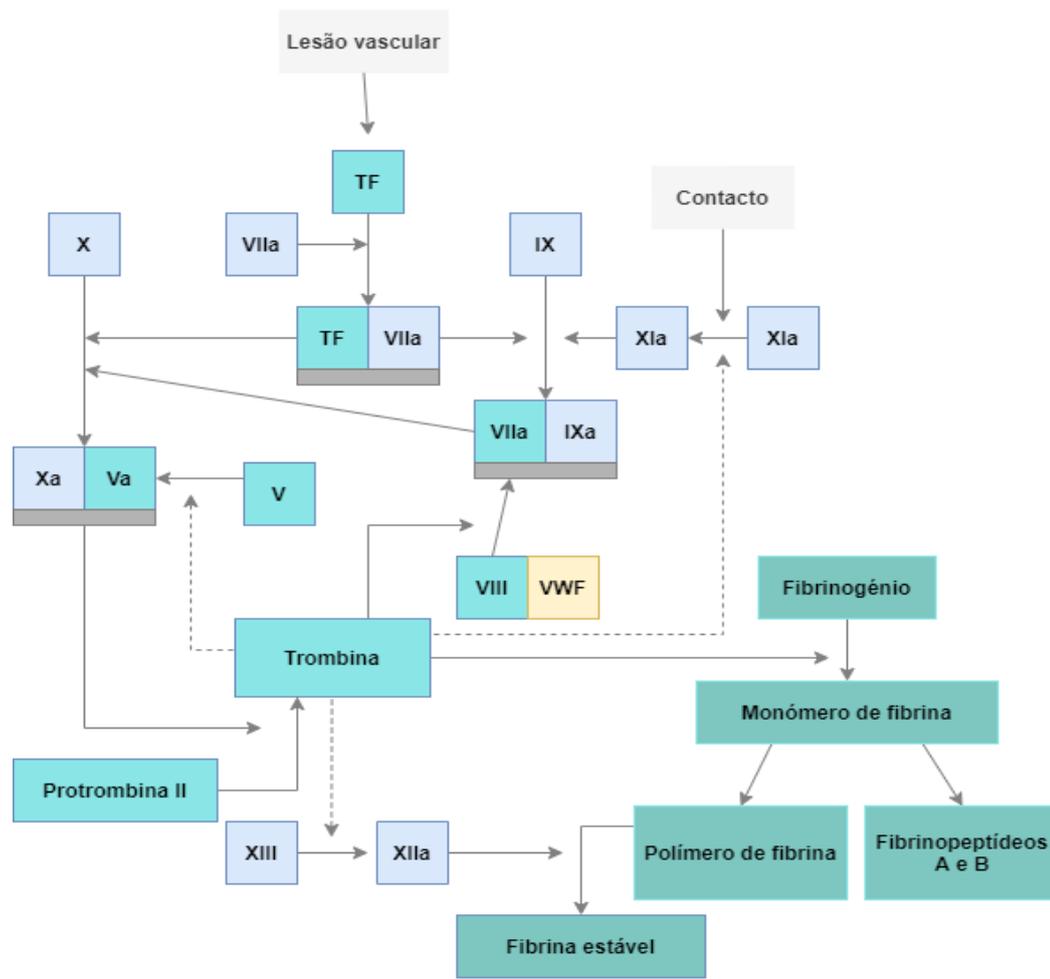


Figura 9- Cascata de coagulação. Quando o plasma entra em contacto com o TF (factor tecidual), o factor VII liga-se ao TF. O complexo TF e VII activado (VIIa) activa X e IX. A formação de trombina a partir da protrombina pela acção do complexo Xa-Va conduz à formação de fibrina. A trombina também activa os factores V, XI e XIII (linha pontilhada). A separação entre o factor VIII e o factor von Willebrand (VWF), pela trombina resulta num aumento acentuado da formação do complexo VIIIa-IXa e do complexo Xa-Va. A hidrólise do fibrinogénio, pela acção da trombina, resulta na formação de fibrina que origina um coágulo estável. Adaptado de (Hoffbrand & Moss, 2017)

4.4.1. Testes de *screening* de coagulação

Os testes de *screening* da coagulação permitem a avaliação da via extrínseca e intrínseca da coagulação, bem como a conversão do fibrinogénio em fibrina.

No LACSM utiliza-se o analisador automatizado Sysmex CA-500 para avaliar o Tempo de Protrombina (TP), o Tempo de Tromboplastina Parcial Activada (aPTT) e o fibrinogénio. Este analisador usa o método de turbidimetria, baseado na detecção foto-óptica de coágulo. O tempo de coagulação é medido a partir da alteração da dispersão da luz devido ao aumento de turvação da amostra, resultante da formação de um coágulo de fibrina, a partir de

fibrinogénio quando o reagente é adicionado ao plasma. (Laffan & Manning , 2017) A luz dispersa é então absorvida por um fotodíodo, que converte a intensidade de luz em sinais eléctricos, que são monitorizados e utilizados por um microprocessador para calcular o tempo de coagulação da amostra. Este método sofre interferências de factores como a hemólise, icterícia e lipémia, dado que a bilirrubina e a hemoglobina absorvem radiação a um comprimento de onda próximo ao utilizado (660 nm), e devido a turvação conferida pelo aspecto lipémico.

a. Tempo de Protrombina

O Tempo de Protrombina (TP) determina o tempo de coagulação do plasma citratado, na presença de uma concentração óptima de tromboplastina tecidular. Este teste presta-se a avaliar a integridade da via extrínseca (factor VII) bem como a via comum (factor II, V, X e fibrinogénio). O estudo do TP permite monitorizar a terapêutica com anticoagulantes orais. Os resultados do TP aplicados neste contexto, não devem ser expressos sob a forma de tempo de formação de coágulo em segundos, devido a ampla variabilidade de tromboplastinas que podem ser usadas entre os laboratórios. De forma a padronizar os resultados obtidos, o TP é reportado na forma da Razão Internacional Normalizada (INR). Esta é obtida através da razão entre o TP do doente e o TP do controlo, elevado à potência do índice de sensibilidade internacional (ISI), o qual é indicado pelo fornecedor do reagente. Deste modo, o controlo da terapêutica pode ser feito em qualquer laboratório, sem que haja consequências nefastas para o paciente. (Laffan & Manning , 2017)

O alongamento do TP é observado na administração de anticoagulantes orais antagonistas da vitamina K, sendo a warfarina a mais comum; em hepatopatias; na hipovitaminose K e na coagulação intravascular disseminada. (Laffan & Manning , 2017)

b. Tempo de Tromboplastina Activada

O aPTT mede o tempo de coagulação do plasma citratado após activação dos factores de contacto, na presença de uma quantidade óptima de fosfolípidos e iões cálcio, fornecidos pelo cloreto de cálcio. Desta forma, dispõe-se a avaliar a integridade da via intrínseca (factores XII, XI, IX, VIII) e comum. (Laffan & Manning, 2017)

Este parâmetro encontra-se prolongado em situações de deficiência ou inibição de um ou mais factores da via intrínseca e/ou comum: Hemofilia A, onde há deficiência do factor VIII; Hemofilia B perante um défice de factor IX; doença de Von Willebrand, associado ao défice da proteína transportadora do factor VIII. (Laffan & Manning, 2017)

c. Fibrinogénio

A determinação do fibrinogénio segue o princípio de Clauss, que se baseia na medição do tempo de coagulação do plasma diluído após a adição de trombina. A trombina vai converter o fibrinogénio no seu polímero não solúvel, a fibrina. Assim, o tempo de coagulação do plasma diluído é inversamente proporcional à concentração de fibrinogénio no plasma. (Laffan & Manning, 2017)

O fibrinogénio é uma proteína de fase aguda sintetizada pelo fígado, pelo que surge aumentada em situações de infecção ou inflamação e diminuídas em hepatopatias mais severas bem como na coagulação intravascular disseminada. (Vajpayee, Graham, & Bem, 2017)

4.5. Velocidade de sedimentação

Este parâmetro traduz a distância percorrida pelos eritrócitos numa coluna vertical, sob influência da gravidade, em sessenta minutos.

No LACSM a Velocidade de Sedimentação (VS) é determinada pelo analisador Ves-Matic Cube 30 que se baseia no método de Westergren. Neste analisador, as amostras começam por ser agitadas de modo a obter-se uma suspensão homogénea de eritrócitos. Seguidamente, é realizada uma primeira leitura através de um sensor óptico-electrónico que determina o nível total de sangue presente no tubo. Ficam em repouso durante um período predefinido e formam agregados celulares que, por sua vez, começam a sedimentar. Por fim, após a sedimentação dos eritrócitos, um segundo sensor realiza uma última leitura. Este ciclo de análise tem a duração de trinta minutos e o resultado é posteriormente extrapolado para uma hora, sendo a VS expressa em mm/h. (Osei-Bimpong & Burthem, 2017)

As membranas dos eritrócitos apresentam carga negativa devido à presença de ácido siálico que gera um potencial de repulsão entre os eritrócitos, o potencial zeta. É este potencial de repulsão que, normalmente, impede o empilhamento dos eritrócitos. Deste modo, perante um aumento da concentração plasmática de proteínas de fase aguda, o potencial zeta é efectivamente neutralizado e, por conseguinte, formam-se os *rouleaux*, que sendo mais densos sedimentam com uma velocidade maior. Contudo, o aumento da VS não se deve exclusivamente ao aumento das proteínas de fase aguda, também se encontra aumentada em casos de infecções crónicas, gamapatias monoclonais e em anemias normocíticas e macrocíticas. Por outro lado, valores diminuídos da VS podem surgir na policitemia vera, na anemia falciforme e nas hipogamaglobulinémias. (Silva, et al., 2016)

As alterações na VS não retractam necessariamente um cenário patológico. Em situações fisiológicas como na gravidez e no envelhecimento, a VS encontra-se aumentada. É um parâmetro que peca quer pela sua baixa especificidade quer pelo seu tempo de processamento e tem vindo a ser substituído pela determinação da proteína C reactiva.

4.6. Grupos sanguíneos

A classificação dos grupos sanguíneos no sistema AB0 é realizada de acordo com o tipo de antigénio presente na superfície dos eritrócitos. Assim, o sangue do tipo A tem antigénios do tipo A, o do tipo B tem antigénios do tipo B, o do tipo AB tem ambos os antigénios e o de tipo 0 não tem antigénios, nem A nem B. O sistema Rh é o mais complexo dos grupos sanguíneos e consiste em pelo menos 50 antigénios, entre os quais o antigénio D que é o mais utilizado na prática clínica. (Mitra, Mishra, & Rath, 2014)

Os sistemas AB0 e Rh são análises requeridas em transfusões sanguíneas. O sistema Rh é também uma análise requerida em grávidas para evitar a doença hemolítica do recém-nascido

A doença hemolítica do recém-nascido, surge na sequência da passagem placentária de eritrócitos fetais para a circulação materna, quando os eritrócitos da grávida são Rh-negativo e os do feto é Rh-positivo. Após a exposição inicial a um antigénio eritrocitário o sistema imune materno produz anticorpos do tipo IgM, que devido ao seu elevado peso molecular não atravessam a placenta. Quando ocorre uma segunda exposição a esse antigénio, é desencadeada a produção de anticorpos do tipo IgG, de baixo peso molecular, que atravessam a barreira da placenta e se ligam aos eritrócitos do feto, destruindo-os. (Izetbegovic, 2013)

Os sistemas AB0 e Rh são normalmente testados em conjunto. Para se conhecerem os grupos sanguíneos executam-se testes do tipo imunohematológico, nos quais são detectados complexos antigénio-anticorpo. No LACSM, a determinação dos grupos sanguíneos é realizada através de cartas de identificação DiaClon AB0/Rh da Bio-Rad, pela técnica de aglutinação em coluna. Em cada poço da carta há uma matriz de gel com um anticorpo monoclonal específico. É preparada a suspensão de eritrócitos com a solução ID-Diluent 2 e o sangue total do utente. Esta suspensão é adicionada aos poços e a carta vai a centrifugar por dez minutos na centrífuga ID-Centrifuge. Durante a centrifugação, os eritrócitos livres depositam-se no fundo dos poços e os eritrócitos que sofrem aglutinação, fixam-se à superfície. (Lapierre, et al., 1990)

5. Microbiologia

Nesta valência participei no processamento das diferentes amostras que foram surgindo no decurso do meu estágio e que se encontram descritos neste relatório. Embora tenha processado do início ao fim vários produtos biológicos, não me deparei com alguns microrganismos habitualmente isolados na prática clínica, como por exemplo parasitas ou micobactérias. Em contrapartida, disponibilizaram-me lâminas da AEQ de forma a sensibilizar-me para as suas estruturas no microscópio. Além do processamento das amostras, participei na validação do VITEK[®]2 COMPACT e na AEQ das fezes parasitológicas, da bacteriologia e do antibiograma.

A Microbiologia clínica tem um papel imprescindível no diagnóstico de doenças infecciosas. Para que se possa dar um resultado fidedigno ao clínico, deve-se ter noção dos microrganismos que constituem a nossa microbiota, bem como dos potenciais agentes patogénicos associados à infecção local. Assim, abordar-se-á todo o processamento das amostras com o respectivo enquadramento teórico.

No LACSM todo o processamento microbiológico é realizado numa sala individual que conta com uma câmara de fluxo laminar, dois frigoríficos, três estufas (duas a 37°C e uma a 42°C), dois microscópios funcionais e os analisadores automatizados VITEK[®] 2 COMPACT, BACT/ALERT[®] e GeneXpert[®]. As atmosferas selectivas são obtidas com recurso ao sistema GENbag, que acopla uma bolsa de plástico e um gerador adequado à atmosfera que se pretende (anaeróbia, microaerofílica ou com elevada concentração de CO₂).

De uma forma geral, o processamento das amostras consiste em realizar a cultura, efectuar o exame directo e executar os testes complementares de identificação. Por fim e como diagnóstico final, escolhe-se as cartas mais adequadas que vão ser utilizadas no VITEK[®]2 COMPACT para a identificação e antibiograma do agente etiológico em questão.

5.1. Urocultura

O tracto urinário do Homem é estéril até à parte terminal da uretra, onde existe alguma microbiota. As infecções no tracto urinário (ITU) podem ocorrer em qualquer pessoa, independentemente da faixa etária e do sexo, embora as mulheres tenham uma maior propensão devido a sua fisiologia e anatomia. Podem ser assintomáticas ou sintomáticas, e neste último caso apresentam hematúria, disúria e polaciúria. (Dilanchian & Hooton, 2016)

A principal via de acesso dos microrganismos ao tracto urinário é a via ascendente. Por isso, o principal mecanismo de defesa das vias urinárias é a micção, uma vez que vai remover os microrganismos que ascendam pela uretra. A própria urina, também constitui um mecanismo de defesa contra as bactérias, devido a sua elevada osmolaridade e o seu baixo pH. (Millner & Becknell, 2019)

Os agentes etiológicos mais frequentes pertencem à família *Enterobacteriaceae*, sendo a bactéria *Escherichia coli* responsável por mais de 80% de todas as infecções urinárias adquiridas na comunidade. (McLellan & Hunstad, 2016)

Para realizar a urocultura, deve-se colher num frasco esterilizado o segundo jacto da primeira urina da manhã, após uma lavagem cuidadosa da zona genital. No entanto, a urina também pode ser colhida por punção de cateter urinário, punção suprapúbica ou através do saco colector. A colheita deve ser realizada antes do início do tratamento com antibiótico e oito dias depois da suspensão terapêutica, no caso de controlo pós- tratamento. (Fonseca, et al., 2004)

A urocultura integra duas etapas: a quantificação dos microrganismos em meios de cultura e a avaliação sumária da urina, acompanhada pela observação do sedimento ao microscópio óptico.

No LACSM todas as uroculturas são realizadas no meio Cistina Lactose Deficiente em Electrólitos (CLED), excepto as uroculturas sinalizadas como urgentes que são semeadas no meio CPS Elite (CPSE).

A gelose CLED é um meio não selectivo e diferencial, já que na sua constituição apresenta lactose e um indicador de pH – azul de bromotimol – que confere a cor amarela ao meio perante um pH ácido. Da fermentação dos açúcares, resulta a acidificação do meio e por isso, as bactérias fermentadoras de lactose se apresentam como amarelas, ao passo que as não fermentadoras se apresentam como verdes, azuis ou incolores. (Zimbro & Power, 2009) Neste meio, as colónias dos bacilos de Gram-negativo são normalmente maiores e mais mucosas que as dos cocos de Gram-positivo. O défice de electrólitos inibe o *swarmig* induzido pela motilidade do género *Proteus spp.*. Assim, evitam-se contaminações e consegue-se efectuar o isolamento e a respectiva identificação das bactérias que cresceram.

O meio CPSE, à semelhança do CLED, também é um meio não selectivo e diferencial. Na sua constituição apresenta substratos cromogéneos específicos que vão ser clivados por enzimas produzidas pelas bactérias. A cor resultante dessa actividade enzimática corresponderá a cor das colónias no meio. As estirpes de *E.coli* como produzem β -glucuronidase e/ou β -galactosidase, aparecem neste meio com a cor rosa. Por outro lado,

bactérias dos géneros *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, produtoras de β -glucosidase, formam colónias azuis. O género *Proteus*, sendo desaminase positiva produz colónias castanhas. (Perry, 2017)

O meio CPSE é utilizado nas urgências exactamente porque a bactéria *E.coli* é o principal agente etiológico das ITU e este meio permite fazer logo a sua identificação presuntiva.

Num primeiro momento as urinas são homogeneizadas por inversão do frasco e semeadas nos respectivos meios com uma ansa calibrada de 10 μ L. Uma vez semeadas, as placas vão à estufa, 37°C em condições de aerobiose durante 18-24h. Paralelamente à realização da sementeira, a urina é vertida para um tubo de forma a realizar-se a avaliação sumária da urina.

5.1.1. Análise sumária da urina

A avaliação sumária da urina integra parâmetros físicos e químicos, nomeadamente: cor, turvação, densidade, bilirrubina, glucose, nitritos, urobilinogénio, proteínas, pH, corpos cetónicos, esterase leucocitária e hemoglobina. No LACSM a urina tipo II é realizada pelo analisador Aution Max AX-4280. Neste aparelho, a determinação dos parâmetros químicos é efectuada através de tiras de papel impregnadas de reagentes. Estas ao contactarem com a urina desencadeiam uma série de reacções, que resultam numa alteração da cor, que será detectada por refletância por duplo comprimento de onda. Por outro lado, as características físicas são avaliadas por refletância (cor), dispersão da luz (turvação) e índice de refração (densidade). (Zaman, Roggeman, & Cappelletti, 2001)

Os parâmetros da urina tipo II mais relevantes neste contexto das ITU são os leucócitos, a hemoglobina e os nitritos. Estes últimos porque todas as enterobactérias são nitratase positiva e são os principais agentes etiológicos das infecções urinárias.

No LACSM a observação do sedimento urinário ao microscópio apenas é executada quando requisitada ou então quando o analisador acusa a presença de muitos leucócitos, de hematúria e de proteinúria, que devem ser sempre confirmados ao microscópio. Para tal, a urina é centrifugada à 1500 r.p.m. durante dez minutos. No microscópio, deve-se observar 10 campos diferentes com a ampliação de 40 \times e detectar a presença de eritrócitos, leucócitos, bactérias, leveduras, parasitas, cristais e células epiteliais (**Figura 10**).

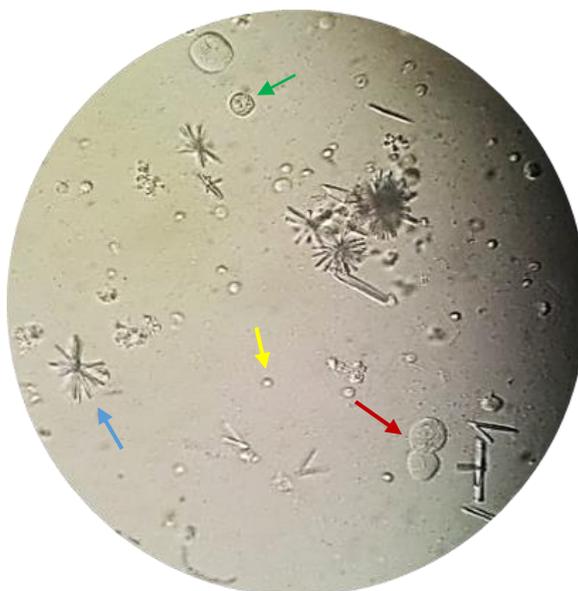


Figura 10- Sedimento urinário com ampliação de 40x. A seta azul aponta para cristais de fosfato de cálcio, a seta amarela para um eritrócito, a seta vermelha para células redondas e a seta verde para um leucócito (Fotografado no LACSM).

5.1.2. Quantificação de microrganismos

A quantificação do crescimento microbiano, em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro de urina (UFC/mL), é feita por comparação do crescimento obtido com os das cartas padrão da bioMérieux.

Uma urocultura é positiva se estiver pura e se existirem pelo menos 10^5 UFC/mL. Note-se que uma cultura pura deve apresentar apenas um tipo de colônia, na qual as colônias devem ser morfológicamente idênticas entre si.

Para as restantes contagens, a valorização do resultado tem em conta o sedimento urinário bem como outros factores como a idade e o estado do utente (algaliado), o histórico de infecções e a orientação da pesquisa. Por exemplo, se a urocultura de um utente algaliado tiver dois tipos de colônias e a contagem for 10^4 , com muitos ou alguns leucócitos no sedimento urinário, faz-se a identificação das duas e reporta-se apenas uma. No que toca ao antibiograma, valida-se os antibióticos que apresentem a mesma susceptibilidade para ambas as bactérias.

Na **Figura 11** encontra-se ilustrado três uroculturas positivas com crescimentos diferentes, nas quais é possível comparar o aspecto das colônias de *E.coli* em meio CPSE e em CLED. bem como as colônias de *Klebsiella* em meio CLED.

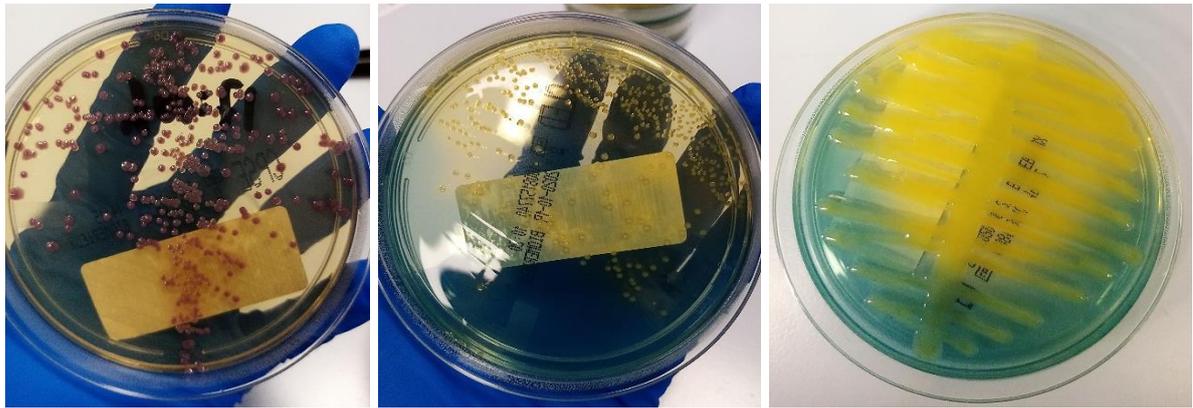


Figura 11- Uroculturas positivas com diferentes contagens. A) Crescimento 10^5 UFC/mL de *E.coli* no meio CPSE; B) Crescimento 10^4 UFC/mL de *E.coli* no meio CLED; C) Crescimento 10^6 UFC/mL de *Klebsiella* no meio CLED (Fotografado no LACSM).

Por fim, faz-se a identificação e o antibiograma das uroculturas positivas no VITEK[®]2 COMPACT. Nas colônias de *E.coli* obtidas no meio CPSE faz-se somente o antibiograma.

5.2. Fezes

As infecções intestinais são a principal causa de diarreia no Homem. A diarreia pode ser causada por bactérias, toxinas ou vírus, a partir da ingestão de água e de alimentos contaminados com fezes. (Genova & Tonelli, 2016) Em pessoas saudáveis, as diarreias geralmente resolvem-se *per si*, durando apenas alguns dias. Contudo, em outras pessoas pode desencadear complicações e evoluir para bacteremia, desidratação, desnutrição e até mesmo para a morte.

O nosso organismo apresenta vários mecanismos de defesa contra estes microrganismos, tais como: o pH baixo do estômago, os movimentos peristálticos do intestino delgado, a presença de IgA na mucosa intestinal e a própria microbiota do intestino que além de competir pelos mesmos nutrientes, vai produzir substâncias que podem ser tóxicas para os agentes patogênicos. Contudo, há microrganismos e toxinas que resistem às defesas do nosso organismo e conseguem aderir, invadir e destruir os enterócitos. (Mahon & Lehman, 2019)

A pesquisa dos agentes etiológicos das gastroenterites deve ser orientada tendo em conta os antecedentes epidemiológicos, a presença de sinais e sintomas clínicos e o tipo de diarreia. Para a coprocultura deve-se colher amostras de fezes num frasco com meio de transporte Cary-Blair modificado, na fase aguda da doença intestinal e antes da antibioterapia. (Fonseca, et al., 2004) Para o exame parasitológico, deve-se colher três amostras de fezes em

dias alternados não ultrapassando os dez dias, num frasco fornecido pelo laboratório. (Direção-Geral da Saúde, 2017) Para a pesquisa de vírus faz-se a colheita de amostras de fezes na fase aguda da doença. (Fonseca, et al., 2004)

5.2.1. Coprocultura

Em todas as coproculturas faz-se a pesquisa de *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* e *Campylobacter spp.*. Desta forma, as coproculturas são semeadas em três meios diferentes: *Salmonella-Shigella* (SS), Campylozel e caldo Selenito. Uma vez semeadas vão para a estufa em condições de atmosfera e temperatura adequadas. O meio SS e o caldo Selenito são incubados a 37°C/18-24h, ao passo que o meio Campylozel é incubado a 42°C, em condições de microaerofilia (5% O₂ + 10% CO₂ + 85% N₂) por 48h.

As amostras de fezes têm uma grande diversidade e quantidade de microrganismos, pelo que é extremamente importante semear a amostra em caldo Selenito. O caldo Selenito é um meio de enriquecimento para *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* que devido a sua elevada concentração de selenito de sódio vai inibir os coliformes bem como outros microrganismos associados. (Zimbro & Power, 2009)

O meio SS é um meio selectivo e diferencial para *Salmonella spp.* e *Shigella spp.*. Esta selectividade deve-se essencialmente à sua elevada concentração de sais biliares e verde brilhante, que inibe o crescimento das bactérias de Gram-positivo, bem como o da grande maioria das enterobactérias que pertencem a nossa microbiota intestinal. Este meio, na sua constituição apresenta lactose e um indicador de pH, o vermelho neutro. Assim, as bactérias fermentadoras de lactose assumem colónias cor-de-rosa e as não fermentadoras colónias incolores. Neste meio também se realiza a pesquisa da tiosulfato redutase, a partir do tiosulfato de sódio e do citrato férrico amoniacal que compõem o meio. Esta enzima reduz o tiosulfato de sódio e produz um gás incolor, o sulfureto de hidrogénio. Este ao reagir com o ião férrico forma sulfureto ferroso que é um precipitado negro, e que pode ser detectado no meio.

No meio SS apenas se valoriza as colónias incolores com ou sem centro negro, uma vez que nem as bactérias *Salmonella spp.* nem *Shigella spp.* fermentam lactose, e a tiosulfato redutase apenas é positiva em algumas estirpes de *Salmonella*. Se ao fim de 24h a cultura não apresentar nenhuma destas colónias, faz-se a repicagem do caldo Selenito para um novo meio SS e vai à estufa nas mesmas condições que foi anteriormente. Se no dia seguinte voltarmos a ter uma cultura negativa, o resultado sai como negativo para *Salmonella spp.* e *Shigella spp.*

Nas culturas positivas, é repicado a colónia de interesse para o meio MacConkey e colocado na estufa a 37°C/18 à 24h. Esta repicagem tem como objectivo o isolamento de colónias puras, para que no dia seguinte seja realizado a sua identificação no VITEK®2 COMPACT com a carta GN. No LACSM não se faz o antibiograma nem de *Salmonella spp.* nem de *Shigella spp.*

No que concerne ao meio Campyloset, este é um meio selectivo para o género *Campylobacter spp.*, já que na sua constituição apresenta vários antibióticos e antimicóticos que vão inibir toda a microbiota associada. As colónias de *Campylobacter spp.* neste meio são mucóides, pequeninas e com bordas irregulares, podendo assumir a forma de chama em vela devido a sua extraordinária motilidade.

Nas primeiras 24h, pode-se retirar a gelose de Campyloset da estufa e verificar se houve algum crescimento. No caso de não apresentar nenhum desenvolvimento microbiano, volta-se a colocar a placa na estufa nas mesmas condições de temperatura e atmosfera por 24h. Ao fim desse tempo, a placa é novamente analisada. Se for negativa, o resultado é dado como negativo para *Campylobacter spp.* Por outro lado, se o meio apresentar colónias faz-se o teste da oxidase que deverá ser positiva.

5.2.2. Exame parasitológico

Os parasitas mais comuns associados às diarreias são: *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Cyclospora cayatanensis* e *Cryptosporidium spp.*, sendo a amebíase a terceira principal causa de morte por parasitas no mundo. (Haque, 2007)

Numa primeira fase, as fezes são avaliadas macroscopicamente, na qual é introduzida numa folha de trabalho a cor, a consistência, a presença de sangue bem como alguma informação adicional pertinente. Paralelamente a esta observação macroscópica, é realizada a concentração das fezes pelo método de sedimentação por centrifugação de Ritchie, que consiste em concentrar quistos, ovos e larvas de helmintas no sedimento, de forma a facilitar a remoção de detritos que ficam à superfície. O sedimento é observado ao microscópio entre lâmina e lamela e pode-se corar com lugol para que as estruturas fiquem mais evidentes. A detecção de apenas uma estrutura parasitária em toda a lâmina, já é indicativo de parasitose. Com a objectiva de 10× procura-se em toda a lâmina ovos e larvas. Se durante esta pesquisa forem detectadas outras estruturas parasitárias sugestivas, foca-se com a objectiva de 40× e confirma-se a suspeita. A pesquisa de quistos deverá ser realizada com a objectiva de 40×.

5.2.3. Pesquisa de Adenovírus e Rotavírus

As infecções por Adenovírus e Rotavírus são as principais causas de diarreia em crianças. Embora esteja mais associado às crianças, também afecta adultos e pode causar diarreias graves e prolongadas em hospedeiros imunocomprometidos. (Ribeiro , et al., 2015)

No LACSM a pesquisa destes vírus é feita individualmente a partir de testes imunoenzimáticos em *kits* Adeno-Strip e RSV-Strip da Coris BioConcept. Num primeiro momento a amostra fecal é diluída numa solução tampão, incluída no kit, e de seguida é mergulhada a tira do teste. Na extremidade da tira estão anticorpos monoclonais contra proteínas específicas do vírus, conjugados a micropartículas de ouro coloidal. Na área teste encontram-se fixados à membrana anticorpos contra o vírus e na zona de controlo os anticorpos contra o conjugado. Se o vírus estiver presente na amostra, o antigénio do vírus liga-se ao conjugado e o complexo migra na membrana por difusão. Os anticorpos que estão na área teste capturam o complexo formado, o que leva ao aparecimento de uma linha vermelha. Como o complexo continua a mover-se ao longo da membrana os anticorpos fixos na zona de controlo reconhecem o conjugado e forma-se a linha controlo. Um teste é positivo e válido se aparecerem as duas linhas.

5.2.4. Pesquisa de *Clostridium difficile*

O microrganismo *Clostridium difficile* é um bacilo de Gram-positivo anaeróbio produtor de esporos e que pode pertencer a nossa microbiota sem causar quaisquer problemas. Todavia, um desequilíbrio na microbiota gastrointestinal, essencialmente devido a tratamentos com antibióticos, desencadeia a proliferação de microrganismos oportunistas, como de *Clostridium difficile*. Nestas condições, esta bactéria causa distúrbios intestinais, que vão desde leves diarreias à colites pseudomembranosas. (Kint, et al., 2020) Este quadro clínico é desencadeado pela produção de toxinas A e B que constituem o principal factor de virulência desta bactéria.

Segundo as directrizes da DGS, a pesquisa deve ser efectuada em todos os doentes com diarreia internados há mais de 72h, bem como a todas as pessoas acima de 65 anos que apresentem diarreia. (Direção-Geral de Saúde, 2014)

No LACSM a pesquisa de *Clostridium difficile* é realizada por testes imunoenzimáticos, a partir do *kit* C.diff quik chek complete[®]. Neste teste são detectadas, em simultâneo, a toxina A e B bem como a glutamato desidrogenase. Sempre que se obtenha um resultado positivo,

deve-se enviar a amostra para um laboratório externo, a fim de confirmar o resultado por testes moleculares.

É importante salientar que a pesquisa de *Clostridium difficile* apenas deve ser feita em amostras diarreicas, já que é uma bactéria que pode pertencer a microbiota de uma pessoa saudável e nesses casos não tem qualquer relevância clínica. (Direção-Geral de Saúde, 2014)

5.3. Exsudados vaginais e uretrais

As infecções do tracto genital podem ser transmitidas por via sexual ou não. Os agentes mais comuns das infecções sexualmente transmissíveis são *Trichomonas vaginalis* e as bactérias *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis*. (Papp, Schachter, Gaydos, & Pol, 2014)

O género *Neisseria spp.* apresenta cerca de onze espécies associadas aos humanos, sendo a espécie *N. gonorrhoeae* sempre patogénica. As restantes espécies geralmente fazem parte da microbiota do nosso tracto respiratório superior e só se tornam prejudiciais em indivíduos imunocomprometidos. (Schielk, Frosch, & Kurzai, 2010) A gonorreia nos homens manifesta-se com corrimento uretral abundante e disúria, ao passo que nas mulheres, 50% não apresenta qualquer sintomatologia. (Song, Yu, Wang, & Stein, 2020)

A candidíase, à semelhança da vaginose por *Gardnerella vaginalis*, resultam de desequilíbrios na flora vaginal. Estes desequilíbrios devem-se principalmente à depleção de *Lactobacillus* que constituem a flora. (Muzny, et al., 2019) Este microrganismo, igualmente denominado por Bacilos de Döderlein, é um bacilo de Gram-positivo produtor de ácido láctico que mantém o pH baixo do lúmen vaginal. Além de produzir este ácido, produz peróxido de hidrogénio e bacteriocinas que têm propriedades antimicrobianas. (Purkayastha, et al., 2020) Por todos estes motivos, o ecossistema vaginal é essencialmente assegurado por esta bactéria.

O estudo microbiológico das infecções genitais é realizado a partir de exsudados vaginais, uretrais ou endocervicais. A colheita do exsudado uretral deve ser efectuada de manhã antes da primeira micção ou após um período mínimo de uma hora desde a última micção. Deve ser realizada com uma zaragatoa mais fina de preferência de alginato de cálcio, que se introduz na uretra e se roda suavemente. Para a colheita do exsudado vaginal, introduz-se uma zaragatoa na vagina o mais profundo possível e fazemo-la rodar por alguns segundos para que as secreções sejam absorvidas. Devem ser sempre recolhidas duas zaragatoas e não se deve fazer qualquer lavagem prévia da zona genital. (Fonseca, et al., 2004)

No LACSM, as pesquisas de *Streptococcus agalactiae* bem como de *Clamydia trachomatis* são realizadas somente quando requeridas pelo médico. Em contrapartida, pesquisa-se sempre

Neisseria gonorrhoeae, *Trichomonas vaginalis*, *Candida spp.* e *Gardnerella vaginalis*, com o fim de diagnosticar casos de gonorreia, tricomoníase, candidíase e vaginose, respectivamente.

O processamento dos exsudados vaginais e uretrais integra o exame microscópio directo e a cultura. Estas amostras são sempre semeadas em geloses de sangue, chocolate e Saboraud. Paralelamente, são sempre realizadas duas lâminas, uma a fresco com soro fisiológico e outra corada pela coloração de Gram (**Anexo II**).

As geloses de sangue e chocolate são incubadas a 37°C na estufa em uma atmosfera capnófila de 5-10% de CO₂ durante 48h. O meio Saboraud é incubado em condições de aerobiose a 37°C na estufa por 24h. Nestas amostras o exame directo constitui o passo mais determinante para o diagnóstico final, já que os meios utilizados no LACSM não são selectivos, à excepção do meio Saboraud, que é selectivo para fungos devido sua acidez e à adição de antibióticos como a gentamicina e o cloranfenicol, que vão inibir o crescimento das bactérias saprófitas.

5.3.1. Pesquisa de *Trichomonas vaginalis*

No exame microscópico directo a fresco procura-se essencialmente *Trichomonas vaginalis*, que é um protozoário flagelado com uma membrana ondulante e que por isso, apresenta um movimento característico e semelhante ao dos dedos de um flautista. É importante ressaltar que as preparações à fresco devem ser observadas com a maior brevidade possível, sob pena de não se visualizar a motilidade deste parasita, que uma vez imobilizado dificilmente se distingue de um leucócito. Este exame a fresco constitui o único método de diagnóstico que o LACSM dispõe para detectar este protozoário.

5.3.2. Pesquisa de *Candida spp.*

Numa situação de candidíase detecta-se a predominância de leveduras no exame microscópico de ambas as lâminas, a fresco e corada. Na coloração de Gram as leveduras apresentam-se roxas, porque retêm o primeiro corante e não descoram pela acção do diferenciador, uma vez que as suas paredes são constituídas por quitina.

No que diz respeito a cultura, deve-se observar o crescimento de leveduras no meio Saboraud. Se nas primeiras 24h os meios ainda não tiverem desenvolvido colónias, as placas permanecem na bancada a temperatura ambiente até o dia seguinte. Assim que se desenvolvam é realizado a sua identificação no VITEK®2 COMPACT com a carta YST.

5.3.3. Pesquisa de *Gardnerella vaginalis*

A bactéria *Gardnerella vaginalis* é um bacilo ou cocobacilo pleomórfico com Gram variável. É um microrganismo β -hemolítico, bastante fastidioso e por isso requer um meio complexo para o seu desenvolvimento, bem como uma atmosfera de 10% de CO₂, já que também é um anaeróbio facultativo. (Gergova, Strateva, & Mitov, 2013) Desta forma, pode eventualmente crescer em gelose de sangue, mas em regra isso não acontece. Assim, o exame directo da preparação corada com a coloração de Gram é a única ferramenta que o LACSM tem para detectar esta bactéria. No exame directo vamos observar a presença de *clue cells*, que são células epiteliais cobertas de bactérias, e poucos ou nenhuns *Lactobacillus spp.* Num individuo saudável seria observado a presença abundante de Bacilos de Döderlein compatível com uma flora saprófita normal, como se encontra ilustrado na **Figura 12**.

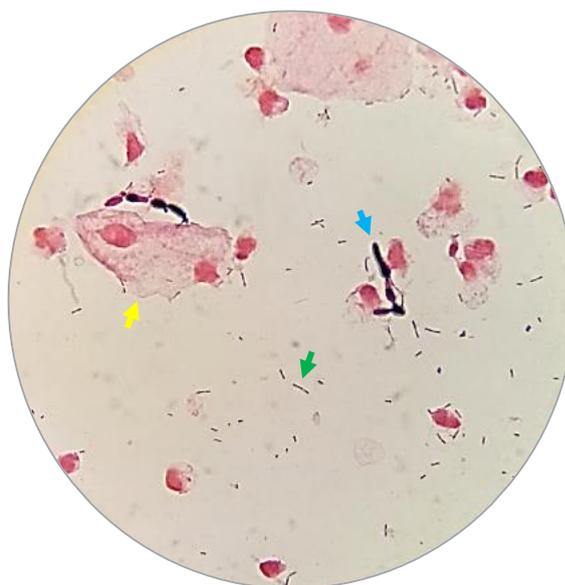


Figura 12- Gram do exsudado vaginal de um individuo saudável com ampliação de 100x. A seta amarela aponta para uma célula epitelial, a verde para Bacilos de Döderlein e a azul para uma levedura (Fotografado no LACSM).

5.3.4. Pesquisa de *Neisseria gonorrhoeae*

No exame directo da coloração de Gram, deve-se detectar a presença de diplococos de Gram-negativo intracelulares sugestivos de *Neisseria gonorrhoeae*, que habitualmente encontram-se no interior dos polimorfonucleares. No LACSM, este achado nos exsudados uretrais dos homens constitui o diagnóstico final, mesmo que a cultura seja negativa. Nas mulheres é sempre necessário confirmar com a cultura, tendo em conta que apresentam uma microbiota mais rica e por isso mais passível de induzir a erro.

Ao fim das 48h retira-se a gelose de sangue e chocolate. Apesar destes dois meios serem meios de enriquecimento e permitir o crescimento de microrganismos fastidiosos e não fastidiosos, esta bactéria não cresce bem na gelose de sangue. Posto isto, a nossa atenção vai centralizar-se no meio chocolate que é mais nutritivo por constituir Polivitex. Na presença de colónias sugestivas de *N. gonorrhoeae* - pequenas, brilhantes e sem qualquer tipo de hemólise - deve-se realizar os testes da catalase e da oxidase que são positivos para esta espécie. Por fim, como diagnóstico final, efectua-se a identificação no VITEK[®]2 COMPACT com a carta NH. O antibiograma é realizado num laboratório externo.

5.3.5. Pesquisa de *Streptococcus agalactiae*

As grávidas, no 3º trimestre de gravidez, devem realizar a pesquisa de *Streptococcus agalactiae* para prevenir a contaminação materno-fetal. (Direção-Geral da Saúde, 2011) Esta bactéria é responsável por meningites, septicemias e pneumonias no recém-nascido. (Coni, et al., 2015)

No LACSM esta pesquisa faz-se através da cultura de exsudados vaginais/anais em gelose Granada. As placas vão para a estufa 37°C/48h numa atmosfera anaeróbia. A gelose Granada é um meio selectivo para a detecção de *Streptococcus agalactiae*. Tem na sua composição uma combinação de antibióticos que vão inibir a maioria das bactérias gram negativas e leveduras. A presença de metotrexato, amido e soro permitem a produção de um pigmento carotenóide, específico das estirpes β-hemolíticas desta espécie. Assim, a pesquisa é considerada positiva sempre que se formem colónias cor-de-laranja. (Zimbro & Power, 2009) Se ao fim de 48h não houver desenvolvimento de colónias com esta cor, o resultado é dado como negativo.

5.3.6. Pesquisa de *Clamidia trachomatis*

A pesquisa de *Clamidia trachomatis* é realizada a partir do kit ABON[™] que é um teste imunocromatográfico. Numa primeira fase, são extraídos os antigénios da amostra a partir de uma solução de extracção. Na extremidade da cassete encontram-se micropartículas revestidas de anticorpos anti-*Chlamydia trachomatis*. Na linha de teste estão impregnados anticorpos monoclonais específicos para o antigénio da bactéria e a linha de controlo apresenta anticorpos contra anticorpos anti-*Chlamydia trachomatis*. Assim, uma vez extraído, forma-se o complexo antigénio-anticorpo entre o antigénio da amostra e as micropartículas revestidas de anticorpo anti-*Chlamydia*. (Sanders, Hook, Welsh, Shepherd, & Quinn, 1994) O complexo antigénio-anticorpo percorre a membrana por capilaridade e é capturado pelos

anticorpos da região de teste, aparecendo uma risca vermelha. O teste é positivo e válido se além da risca na linha teste aparecer igualmente uma risca na linha de controlo.

5.4. Secreções respiratórias

As infecções do tracto respiratório são causadas por uma ampla variedade de microrganismos, que incluem agentes virais e bacterianos. Estes microrganismos podem infectar o tracto respiratório superior e desencadear gripes e faringites, como também podem infectar o tracto inferior e desenvolver bronquites e pneumonias. As infecções do tracto respiratório inferior são uma das principais causas de morbidade e mortalidade, especialmente em crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos. (Kuypers, 2020)

Face a pandemia que estamos a viver, o LACSM reforçou as suas medidas de segurança. Todas as amostras respiratórias devem chegar ao laboratório em contentores terciários com a respectiva requisição fora do contentor. Estes contentores só podem ser abertos dentro da câmara de fluxo laminar e o técnico deve estar devidamente equipado e protegido, da cabeça aos pés. Assim que se termine de processar as amostras, deve-se ligar a radiação ultravioleta da câmara e abandonar a sala por quinze minutos. É importante ressaltar que é uma conduta que se deve assumir perante qualquer amostra respiratória, mesmo que se trate de uma simples pesquisa com um teste rápido.

5.4.1. Exsudados nasais e faríngeos

Na colheita de exsudados nasais deve-se introduzir uma zaragatoa nas fossas nasais até que se encontre uma resistência da cartilagem e rodar suavemente contra a mucosa nasal de ambos os lados. Para a colheita de exsudados faríngeos, aplica-se uma zaragatoa nas zonas tonsilares, sobretudo em locais onde apresentem inflamação, pus ou formação de cápsula, evitando sempre o contacto com as paredes da cavidade oral. (Fonseca, et al., 2004)

a. Estudo da colonização de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente

No LACSM os exsudados nasais são utilizados essencialmente para estudar a colonização de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA). Esta pesquisa pode ser realizada a partir da cultura no meio cromogénico chromID™ MRSA SMART (MRSM) ou então por testes moleculares no GeneXpert®. Na requisição deve constar o método que deverá ser utilizado.

As bactérias MRSA têm vindo a ser reconhecidas como um dos principais agentes causadores de infecções associadas aos cuidados de saúde. Não obstante, as infecções causadas por MRSA se encontrarem normalmente restritas em ambiente hospitalar, nas últimas duas décadas surgiram novas estirpes de MRSA com capacidade de colonizar e infectar indivíduos saudáveis fora do ambiente hospitalar. Estas estirpes de MRSA associadas à comunidade conjugam resistência à meticilina com maior virulência e aptidão, tornando-se assim num importante problema de saúde pública. (Negrinho, Ferreira, Serrano, Ribeiro, & Shone, 2019) Desta forma, a DGS implementou a Norma 18/2014, onde estão descritos os critérios que devem ser atendidos para a realização deste rastreio. (Direção-Geral de Saúde, 2014)

O meio MRSM é um meio selectivo e diferencial para MRSA. Na sua composição apresentam uma combinação de antibióticos que inibem o crescimento de *Staphylococcus* meticilina sensíveis bem como de outros microrganismos, favorecendo o crescimento de MRSA. Este meio é composto também por substratos cromogéneos específicos de enzimas produzidas por MRSA que conferem a cor rosa às colónias desta estirpe. (Perry, 2017) No LACSM coloca-se sempre a hora e a data em que estas placas foram semeadas e vão para a estufa a 37°C/18-24h.

No GeneXpert® é realizado a detecção de MRSA a partir da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em tempo real. Este é um auto-analizador que extrai, concentra, amplifica e identifica sequências de ácido nucleico-alvo no genoma bacteriano/viral.

A resistência de *S.aureus* à meticilina é codificada pelo gene *mecA* e pelo gene *mecC* que se encontram associados a um elemento móvel denominado *Staphylococcal Chromosome Cassette mec* (SCCmec). Assim, neste aparelho vão ser utilizadas sondas dirigidas a estes três genes. (Crobach, et al., 2016)

b. Pesquisa de *Streptococcus* β-hemolítico do grupo A.

Os exsudados faríngeos são utilizados para a pesquisa de *Streptococcus* β-hemolítico do grupo A, igualmente conhecido por *Streptococcus pyogenes* e que é o principal agente etiológico das faringites bacterianas. (Yu, Zheng, & Yang, 2020) Para tal, o LACSM dispõe o teste imunocromatográfico Clearview® Exact Strep A.

Neste teste, os antígenos da amostra têm de ser previamente extraídos a partir da solução de extracção que vem incluída no *kit*, e só depois é adicionado umas gotas desta suspensão à cassette. Na extremidade da cassette encontram-se anticorpos anti-*Streptococcus*

pyogenes conjugados a micropartículas de ouro coloidal. Na área teste encontram-se anticorpos anti-*Streptococcus pyogenes* fixados à membrana, e na zona controlo anticorpos contra o conjugado. Se a bactéria estiver presente na amostra, o antígeno liga-se ao conjugado e o complexo migra por capilaridade ao longo da membrana. Os anticorpos que estão fixos na área teste capturam o complexo formado, o que leva ao aparecimento de uma linha vermelha. Como o complexo continua a mover-se ao longo da membrana, os anticorpos que estão fixados na zona controlo reconhecem o conjugado e forma-se a linha controlo. (Gupta, Talwar, & Gupta, 1992)

Quando o resultado do teste rápido dá negativo em crianças, o médico geralmente pede o exame cultural para confirmação, isto porque a infecção de *S.pyogenes* nas crianças evolui facilmente para situações mais complicadas como a febre reumática e a escarlatina. Assim, nestas situações a amostra é semeada numa gelose de sangue e é colocada na estufa 37°C/18-24h com atmosfera capnófila. No dia seguinte deverá ser observado a β -hemólise característica deste microrganismo bem como a catalase que deverá ser negativa.

5.4.2. Expectoração

O tracto respiratório inferior é estéril. Todavia, quando o sistema imunitário está debilitado ou na sequência de uma infecção primária causada por um vírus, os microrganismos das vias respiratórias superiores podem invadir e desencadear infecções no tracto respiratório inferior. Por outro lado, pode ocorrer infecções primárias por microrganismos patogénicos que possam ser inalados, como no caso da tuberculose. Os microrganismos mais isolados e valorizados na prática clínica são *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Mycobacterium tuberculosis*. (Mahon & Lehman, 2019)

Um dos principais sintomas é a tosse produtiva, e por isso, o exame microbiológico da expectoração é uma ferramenta imprescindível para o diagnóstico. A expectoração para cultura deve ser colhida de preferência de manhã cedo, em jejum, depois de lavar a boca e gargarejar só com água. A amostra deve ser obtida por tosse profunda e recolhida num frasco estéril. (Fonseca, et al., 2004) As expectorações induzidas devem vir identificadas como tais, sob pena de serem rejeitadas, já que se assemelham a saliva.

No LACSM, as expectorações são semeadas nas geloses de sangue, chocolate, Chapman, MacConkey e Saboraud. Os dois primeiros meios vão incubar a 37°C/24-48h com uma atmosfera de 5-10% de CO₂, e os restantes meios vão a 37°C/18-24h em aerobiose. Em

todas as amostras de expectoração, efectua-se a coloração de Gram e a de Kinyoun (**Anexo III**)

No exame directo da coloração de Gram, observa-se pelo menos dez campos com a ampliação de 10× para avaliar a qualidade da amostra. Esta avaliação segue os critérios de Murray e Washington (**Tabela IV**). As amostras que se encontram inseridas nos grupos 1-3 são consideradas salivas e, por conseguinte, rejeitadas. Por outro lado, as amostras pertencentes aos grupos 4 e 5 são válidas e podem prosseguir com o processamento.

Tabela IV- Critérios de Murray e Washington. (Fonseca, et al., 2004)

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

Seguidamente e com a objectiva de 100× em óleo de imersão, verifica-se se existe predominância de algum tipo morfológico. O microrganismo predominante vai corresponder ao agente etiológico da infecção e o exame cultural deverá estar de acordo com o que se viu.

A gelose de sangue permite-nos identificar o tipo de hemólise característico de cada microrganismo e que é efectivamente útil para orientar o processamento. A presença de colónias α -hemolíticas (**Figura 13A**), e portanto com um halo esverdeado, pode ser sugestivo de *S.pneumoniae*. Por outro lado, a presença de colónias β -hemolíticas pode sugerir *S.pyogenes* ou *S.aureus* (**Figura 13B**). Note-se que há outras espécies que assumem estes dois tipos de hemólise e que não têm qualquer relevância clínica, por isso, é sempre necessário realizar os testes complementares de identificação e correlacioná-los entre a cultura e o Gram.

Na gelose de chocolate vamos estar particularmente atentos ao crescimento de colónias translúcidas sugestivas de *H. influenzae*. Estes microrganismos são extremamente fastidiosos e não crescem nos restantes meios, uma vez que requerem o factor V (nicotinamida adenina dinucleótido) e o factor X (hemina) para se desenvolverem. (Lorian, 2005) Estes microrganismos são bacilos ou cocobacilos de Gram-negativo com oxidase e catalase positiva.

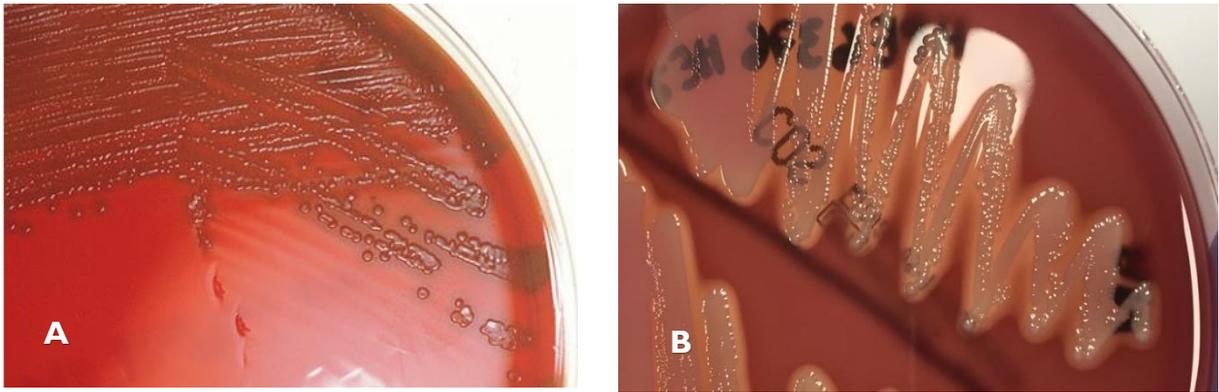


Figura 13- Colónias hemolíticas na gelose de sangue. A) Colónias α -hemolíticas (Mahon & Lehman, 2019); B) Colónias β -hemolíticas. (Fotografado do LACSM)

O meio MacConkey é um meio selectivo para enterobactérias bem como para outras bactérias de Gram-negativo, devido a sua composição em sais biliares e cristal violeta que inibem o crescimento das bactérias de Gram-positivo. É também um meio diferencial, porque além da lactose, apresenta o indicador de pH vermelho neutro que confere a cor rosa às colónias fermentadoras de lactose. As colónias não fermentadoras ou são incolores ou assumem uma ligeira coloração bege. Se as colónias forem incolores, brilhantes, com bordas irregulares e apresentarem um cheiro agradável, provavelmente estaremos perante *Pseudomonas spp.*

A gelose de Chapman serve essencialmente para efectuar a identificação presuntiva de *S.aureus*. Estes microrganismos sendo halotolerantes e fermentadores de manitol, assumem colónias amarelas e pequeninas neste meio. A composição do meio em 7.5% de NaCl inibe o crescimento da grande maioria das bactérias e a presença de vermelho de fenol juntamente com o manitol, permite-nos discriminar as colónias fermentadoras deste açúcar das não fermentadoras.

O meio Saboraud destina-se ao isolamento de fungos. É importante ressaltar que em pedidos não orientados para fungos, as placas são descartadas ao fim de 48h se estiverem negativas.

Por fim, faz-se a repicagem da colónia de interesse para um novo meio, a fim de se obter uma cultura pura e de se proceder com a identificação e o respectivo antibiograma no VITEK[®]2 COMPACT. Caso se verifique diferentes microrganismos na coloração de Gram, considera-se a amostra polimicrobiana e o exame cultural não é valorizado.

No LACSM, faz-se a pesquisa de BAAR (Bacilos Ácido-Álcool Resistentes) a partir do exame directo da coloração de Kinyoun. Nesta coloração, os BAAR apresentam-se cor-de-rosa, porque retêm o primeiro corante e não descoram por acção do diferenciador, ao passo

que os restantes microrganismos descoram e ganham a tonalidade do segundo corante, o azul de metileno. Posto isto, observa-se com a ampliação de 100× e em óleo de imersão, pelo menos cem campos. Basta detectar um BAAR para que o resultado seja positivo.

No LACSM, o exame directo para a pesquisa de BAAR é executado em todas as expectorações, independentemente se consta na requisição ou não. Como o exame cultural não é realizado no LACSM, as amostras com pedidos orientados são enviadas para um laboratório externo depois de terem sido examinadas ao microscópio.

5.5. Tecidos e exsudados purulentos de feridas

O pus é semeado em gelose de sangue, chocolate, Chapman, Saboraud, MacConkey e BHI (*Brain Heart infusion*). Os meios MacConkey, Chapman, Saboraud e BHI são incubados a 37°C/18-24h. As geloses de sangue e chocolate são incubadas a 37°C/24-48h numa atmosfera com 5-10% de CO₂.

O meio BHI é um caldo líquido de enriquecimento e que se apresenta turvo quando há crescimento microbiano. Como não se pode semear tecidos pelo método convencional, verte-se o caldo BHI para o recipiente estéril onde está o tecido, e seguidamente é incubado a 37°C/18-24h na estufa.

Para qualquer um dos produtos biológicos, sempre que haja turvação no caldo BHI, mas não se verifique desenvolvimento microbiano nos restantes meios, faz-se a repicagem do meio BHI para os cinco meios e vão incubar nas mesmas condições de atmosfera, tempo e temperatura que foram inicialmente.

No LACSM não se observa a coloração de Gram destas amostras e a valorização dos microrganismos é realizado de acordo com o exame cultural. Na valorização das colónias deve-se ter em conta o tipo de ferida bem como a localização anatómica da mesma. É importante que estas informações sejam transmitidas ao laboratório, até porque se pode valorizar mais do que um tipo de microrganismo nestas amostras, Nessas situações validam-se os antibióticos que apresentem a mesma susceptibilidade para ambas as bactérias. (Carson, 2016)

5.6. Líquidos orgânicos

Entende-se por líquidos orgânicos, os líquidos: ascítico, pleural, sinovial e cefalorraquidiano. Neste grupo de amostras, apenas tive oportunidade de processar o líquido

pleural. Num primeiro momento, os líquidos são centrifugados e o seu sedimento é semeado em gelose de sangue, chocolate, Chapman, MacConkey, Saboraud e BHI. As geloses de sangue e chocolate são incubadas a 37°C/24-48h numa atmosfera de 5-10% de CO₂. Os restantes meios vão à estufa 37°C/18-24h. Faz-se ainda uma avaliação macroscópica do líquido, onde é referido na folha de trabalho o aspecto do mesmo. Estes líquidos são estéreis em indivíduos saudáveis e por isso, qualquer microrganismo isolado deve ser valorizado, seguindo-se a identificação e o antibiograma do mesmo.

Paralelamente à cultura, faz-se o exame directo com a coloração de Gram da amostra, na qual vamos verificar a abundância de polimorfonucleares bem como a presença de microrganismos. Se o exame directo for positivo, transmite-se imediatamente essa informação ao médico, referindo a morfologia cocóide/bacilar do microrganismo bem como o Gram correspondente. Desta forma o médico pode iniciar a terapia empírica, evitando que esta situação evolua para sepsis.

5.7. Hemoculturas

A hemocultura consiste em detectar uma infecção sistémica causada por bactérias ou fungos. Em indivíduos sem estas infecções, a amostra de sangue obtida deverá ser estéril.

Nas hemoculturas, devem ser colhidas pelo menos duas amostras por doente, em diferentes tempos no mesmo dia. Estas amostras são injectadas directamente em frascos de cultura Bactec. Ao laboratório devem chegar pelo menos dois frascos de cultura por cada amostra, um para anaeróbios e outro para aeróbios. Estes são colocados no BACT/ALERT®, onde ficam a incubar durante cinco dias a uma temperatura de 37°C.

Na presença de microrganismos, os nutrientes do meio de cultura são metabolizados e liberta-se CO₂. Na base de cada frasco de hemocultura existe um sensor permeável ao CO₂, que adquire a cor amarela devido a acidificação do meio induzida pela presença deste gás. A mudança de cor é monitorizada a cada dez minutos, por colorimetria.

Em hemoculturas positivas, efectua-se o exame directo da coloração de Gram e subculturas nas geloses de sangue, chocolate, Chapman, MacConkey e BHI. Os dois primeiros meios vão a incubar a 37°C/24-48h numa atmosfera de 5-10% de CO₂. Os restantes meios vão a estufa 37°C/18-24h. Qualquer microrganismo observado no exame directo ou no exame cultural é valorizado e deve prosseguir para a identificação e determinação do antibiograma no VITEK®2 COMPACT.

A positividade da hemocultura deve ser transmitida de imediato ao médico, referindo a morfologia cocóide/bacilar do microrganismo bem como o Gram do mesmo. Assim, o doente pode iniciar a terapia empírica enquanto aguarda pelo diagnóstico final. Todavia, uma hemocultura positiva nem sempre é representativa de infecção. Pode ser resultado de uma contaminação da flora da pele devido a erros procedidos durante a colheita.

5.8. Testes complementares de identificação

5.8.1. Teste da catalase

A catalase é uma enzima intracelular que decompõe o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). A pesquisa de bactérias produtoras desta enzima é realizada pelo teste da catalase. Este teste consiste em aplicar uma gotinha de peróxido de hidrogénio numa colónia que foi previamente colocada numa lâmina. O teste é positivo se for observado a libertação de bolhas de oxigénio. (Azadi, Motallebirad, Ghaffari, & Shojaei, 2018) Este teste serve para discriminar as bactérias que pertencem à família *Micrococcaceae* (catalase positiva) das que pertencem à família *Streptococcaceae* (catalase negativa).

No LACSM, o teste da catalase é na grande maioria das vezes realizado em colónias provenientes da gelose de sangue, já que este é o nosso meio de eleição para repicagem de bactérias de Gram-positivo. Ora, na gelose de sangue há eritrócitos, que por sua vez também têm catalase. Assim, é importante ressaltar que na execução deste teste deve-se evitar tocar com a ansa no meio, sob pena de obter-se uma catalase falsamente positiva devido à catalase dos eritrócitos e não da bactéria em questão.

5.8.2. Teste da oxidase

A citocromo oxidase é uma hemoproteína que actua na fase final da cadeia transportadora de electrões da respiração aeróbia, onde catalisa a oxidação do citocromo c, que reduz o oxigénio para formar água.

O teste da oxidase utiliza a solução de dihidroclorato de tetrametil-p-fenilenodiamina, um reagente que servirá como doador artificial de electrões ao citocromo oxidado. Desta forma, na presença da citocromo oxidase, o citocromo é oxidado e posteriormente será reduzido por este reagente. Este reagente no estado reduzido é incolor e no estado oxidado é azul púrpura. Na execução deste teste, deve-se utilizar uma ansa de vidro ou de plástico, a fim de evitar falsos positivos.

Este teste é utilizado na prática clínica para discriminar microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, que são oxidase negativa, das restantes bactérias com oxidase positiva como *Pseudomonas*, *Neisseria* e *Campylobacter*.

5.9. VITEK®2 COMPACT

No LACSM, a identificação definitiva e a determinação da susceptibilidade antimicrobiana são realizadas pelo analisador VITEK®2 COMPACT da bioMérieux, no qual os microrganismos são identificados com base nas suas características metabólicas e perfil bioquímico. (Ligozzi et al., 2002)

As cartas de identificação são compostas por poços onde ocorrem os testes bioquímicos convencionais, ao passo que as cartas do antibiograma são compostas por poços com concentrações conhecidas de antibióticos. (Livermore, et al., 2002)

A escolha das cartas de identificação e antibiograma é realizada de acordo com os resultados obtidos no exame cultural, Gram e nas provas complementares de identificação. Na **Tabela V** encontram-se representadas as cartas utilizadas no LACSM e a sua aplicabilidade. Posto isto, a partir de culturas puras são preparadas suspensões em solução de cloreto de sódio 0,45%, com uma densidade equivalente a um padrão McFarland. (Livermore, et al., 2002)

Após as cartas serem introduzidas no aparelho, a análise começa com a aspiração e posterior inoculação das suspensões microbianas nos respectivos poços. A monitorização contínua do crescimento microbiano é realizada por fluorescência e a susceptibilidade antimicrobiana é estudada por turbidimetria. (Livermore, et al., 2002; Ligozzi, et al., 2002)

No final do ciclo de incubação, o perfil bioquímico do microrganismo em estudo é comparado com outras estirpes de microrganismos que constam no banco de dados incorporado no sistema. O resultado da identificação é apresentado sob forma de probabilidade em percentagem. (Ligozzi, et al., 2002) Já o antibiograma é determinado a partir dos valores de Concentração Mínima Inibitória (CMI) determinados para cada um dos antibióticos e que corresponde a diluição mais baixa onde há inibição do crescimento microbiano. É-lhe atribuído um critério sensível ou resistente, segundo as normas da agência europeia EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*).

No VITEK®2 COMPACT é emitido o alarme “microrganismo alerta”, sempre que o microrganismo em estudo for resistente a um certo antibiótico, mas a sua estirpe selvagem não. Pode eventualmente não se tratar de uma verdadeira resistência e ser resultado de uma contaminação.

Na validação dos antibióticos deve-se ter em conta o local da infecção bem como a idade do doente e se está grávida ou não.

Tabela V- Cartas utilizadas no VITEK®2 COMPACT e a sua respectiva aplicação.

Carta	Densidade McFarland	Aplicação
AST-P586	0.50 – 0.63	TSA para <i>Streptococcus spp.</i> e <i>Enterococcus spp.</i>
AST-P648	0.50 – 0.63	TSA para <i>Staphylococcus spp.</i>
AST-N355	0.50 – 0.63	TSA para enterobactérias (uso hospitalar).
AST-N359	0.50 – 0.63	TSA para enterobactérias (uso ambulatorio).
AST-N373	0.50 – 0.63	TSA para bacilos de Gram-negativo não fermentadores.
GP	0.50 – 0.63	Identificação de cocos de Gram-positivo.
GN	0.50 – 0.63	Identificação de bacilos de Gram-negativo.
NH	2,70 – 3.30	Identificação de <i>Neisseria</i> e <i>Haemophilus</i> .
YST	1.80 – 2.20	Identificação de leveduras.

TSA – Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos.

A cada novo lote, executa-se o controlo das cartas do aparelho VITEK®2 COMPACT. Neste processo utilizam-se estirpes ATCC (*American Type Culture Collection*), cujas culturas são padronizadas quanto às suas características de crescimento, fermentação de açúcares, propriedades bioquímicas e sensibilidade a agentes antimicrobianos. Estas estirpes são processadas como se de uma amostra se tratasse e os resultados obtidos são comparados com os resultados esperados para cada estirpe ATCC.

6. Imunologia

Nesta valência avalia-se a função tiroideia, determinam-se os marcadores tumorais, as hormonas de reprodução e os marcadores de serologia infecciosa. Além de se utilizarem equipamentos automatizados (**Tabela VI**), executam-se técnicas manuais para o *screening* de doenças infecciosas (**Tabela VII**). Para a grande maioria das determinações utiliza-se soro, excepto para os testes da Malária e do Dengue, que se utiliza sangue total.

Durante o meu estágio participei na manutenção e controlo dos equipamentos e executei as técnicas manuais. De todas as valências foi a que eu tive uma participação menos activa na validação analítica.

Tabela VI- Parâmetros determinados pelos analisadores e a sua respectiva metodologia.

Siemens Advia Centaur XP		
Metodologia		Parâmetros
Quimioluminiscência	Imunoensaio Competitivo	anti-Hbe, Ag HBs, HBcT, TST, T3, VB12, T4, ATPO, Folato, FT4, ATG e FT3.
	Imunoensaio em Sandwich	AFP, CA19-9, anti-HCV, CEA, PTH, Ag HCV, fPSA, TSH, anti-Hbs, PSA, HIV (Agp24 + anti-HIV1/2), Ag HBe, CA15-3 e CA125.
Siemens Advia Centaur CP		
Quimioluminiscência	Imunoensaio Competitivo	Estradiol
	Imunoensaio em Sandwich	FSH, LH, PRL, VRDL, HAVM e aHAVT.
VIDAS		
Fluoroenzimático	Imunoensaio em Sandwich	Progesterona, IgG/IgM do CMV, IgG/IgM da Rubéola e IgG/IgM de <i>Toxoplasma Gondii</i> .

Ag – Antígeno; Ig – Imunoglobulina; HB – Hepatite B; s- superfície; c- core; e – envelope; T4 – Tiroxina; T3 – Triiodotironina; FT4 – T4 livre; FT3 – T3 livre; HAV- Vírus da Hepatite A; HCV – Vírus da Hepatite C; HIV – Vírus de Imunodeficiência Humana; CMV – Citomegalovírus; TSH – Hormona estimulante da Tiróide; ATPO – Anticorpo anti-peroxidase; ATG – Anticorpo anti-tiroglobulina; FSH – Hormona Folículo-estimulante; LH – Hormona Luteino-estimulante; PRL – Prolactina; PSA – Antígeno específico da próstata; fPSA – PSA livre; CA – Antígeno Carbohidrato; CEA – Antígeno Carcinoembrionário; PTH – paratormona; TST – testosterona; VB12 – Vitamina B12; AFP – Alfa-fetoproteína; VRDL – *Veneral research disease laboratory*

Tabela VII- Técnicas manuais na serologia.

Teste	Kit	Aplicação
Widal	Micropath® Antigenos/Febrile	Detecção de anticorpos anti- <i>Salmonella</i> .
Rose Bengal	Brucelloslide-Test	Screening de Brucelose.
Paul Bunnell	Mascia Brunelli	Screening de mononucleose infecciosa.
VRDL	RPR-nosticon® II	Screening de Sífilis.
Waalser-Rose	Avitex® Rose Waaler	Detecção do factor reumatóide.
Dengue	SD Bioline Dengue Duo	Screening do vírus da dengue.
Malária	SD Bioline Malaria Ag P.f/P.v	Detecção de antígenos de <i>Plasmodium falciparum</i> e de <i>Plasmodium vivax</i> .

7. Bioquímica

A Bioquímica é uma valência de excelência que integra uma vasta quantidade de parâmetros que vão complementar o diagnóstico clínico em qualquer uma das áreas. A partir de biomarcadores locais, consegue-se avaliar a funcionalidade dos órgãos e tecidos e, por conseguinte, chegar a etiologia das perturbações metabólicas.

No decurso do meu estágio participei na manutenção diária dos analisadores bem como na execução e reconstituição dos controlos internos. Tive a oportunidade de processar outras amostras para além do soro e urina, como os líquidos sinovial e pleural, que além de serem introduzidas nos analisadores, passam por uma avaliação macroscópica. Por ser a valência que analisa um maior número de parâmetros, também é aquela que dispõe mais metodologias e exige uma constante manutenção de reagentes ao longo do dia.

Nesta valência as amostras mais usadas são soro e urina, mas também se utilizam fluidos dos espaços potenciais. Nestes últimos determinam-se sobretudo proteínas, glucose e lactato desidrogenase que juntamente com a avaliação do aspecto e da viscosidade, permite-nos caracterizar o processo inflamatório.

Na urina, são avaliadas as urinas tipo II e a de 24h que são de grande utilidade no rastreio, diagnóstico e monitorização de doenças renais. Na urina realiza-se ainda o teste da gravidez e a detecção qualitativa de drogas de abuso (anfetaminas, canabinóides, cocaína e opiáceos), através de testes imunocromatográficos em cassete.

O soro é a amostra mais utilizada nesta área e é efectivamente onde se determina a grande maioria dos parâmetros bioquímicos e que se encontram descritos na **Tabela VIII**.

A grande maioria dos parâmetros é determinado por métodos espectrofotométricos, imunoturbidimétricos e potenciométricos. Posto isto, torna-se evidente que a hemólise, a icterícia e a lipemia vão constituir os principais interferentes das análises realizadas nesta valência. Por um lado, por interferências espectrais, absorvendo a radiação no mesmo comprimento de onda do que os analitos de interesse. Por outro lado, vão ter na sua composição componentes intracelulares que correspondem aos mesmos analitos que se deseja determinar e por isso, as suas concentrações estarão falsamente elevadas.

Tabela VIII- Parâmetros determinados na Bioquímica e a sua respectiva metodologia.

Siemens ADVIA® 1800 Clinical Chemistry	
Metodologia	Parâmetros
Colorimetria	Fosfatase ácida, magnésio, proteínas totais, bilirrubinas, colesterol HDL, colesterol total, triglicéridos, creatinina, alanina transaminase, aspartato transaminase, glucose, ácido úrico, ureia, cálcio, albumina, ferro e fósforo inorgânico.
Colorimetria Enzimática	γ -glutamil-transferase, lipase, amilase e fosfatase alcalina.
Cinética Enzimática	Ureia, creatina cinase, lactato desidrogenase e colesterol LDL.
Imunoturbidimetria	β 2-microglobulina, factor reumatóide, C3, C4, microalbumina, proteína C reactiva, anti-estreptolisina O e α 1-antitripsina.
Potenciometria	Sódio, cloreto, potássio e osmolaridade.
Roche® cobas e 411 analyzer	
Quimioluminiscência	β - HCG, CK-MB , nT-proBNP.
Capillarys 2 SEBIA	
Electroforese capilar	Proteínas séricas e urinárias: α 1-globulina, β 1-globulina, α 2-globulina, β 2-globulina, albumina e γ -globulina.
Aution-Max AX-4280	
Espectrofotometria de refletância	Densidade, cor, turvação, pH, glucose, corpos cetónicos, urobilinogénio, nitritos, hemoglobina, bilirrubina, esterase leucocitária e proteínas.
Spotlyte	
Potenciometria	Lítio.

8. Discussão de casos clínicos

8.1. Insuficiência renal crônica

O caso clínico que se segue é de uma mulher de 80 anos que faz hemodiálise. Na **Tabela IX** consta os resultados que obteve numa das análises que fez no LACSM.

Tabela IX- Resultados laboratoriais obtidos.

Parâmetros	Resultado	Valores de referência	Unidades
HEMATOLOGIA			
Eritrócitos	2.59	4.00 – 5.20	10 ¹² /L
Hemoglobina	8.1	12.0 – 16.0	g/dL
VCM	97	80 – 100	fL
HCM	32	26 – 34	pg
CHCM	33	32 – 36	g/dL
RDW	14.3	11.6 – 14.0	%
BIOQUÍMICA			
Ureia	136	19 - 49	mg/dL
Creatinina	7.78	0.50 – 1.10	mg/dL
Ferritina	263	10.0 - 120.0	µg/dL
Ferro sérico	38	50 - 170	µg/dL
TIBC	209	250 - 425	
Saturação de Transferrina	18	20 - 50	%
Na ⁺	143	132-146	mmol/L
K⁺	6.1	3.5-5.5	mmol/L
Cl ⁻	109	99-109	mmol/L
Cálcio	7.1	8.7-10.4	mg/dL
Fósforo inorgânico	5.6	2.4-5.1	mg/dL
Magnésio	1.7	1.3-2.7	mg/dL
PCR	22.0	<5.0	mg/L
ENDOCRINOLOGIA			
PTH	180	12 -67	pg/mL

Adaptado de boletim clínico obtido no Laboratório de Análises Clínicas SYNLAB Madeira.

A destruição progressiva dos nefrónios leva a depleção da vitamina D activa, e consequentemente, a diminuição da absorção intestinal do Ca^{2+} . A diminuição do Ca^{2+} faz-se sentir nas glândulas paratiróides que vão produzir paratormona (PTH), que é a hormona responsável pela regulação do cálcio. Quando ocorre uma diminuição do Ca^{2+} , ocorre então a produção da PTH que por um lado vai desencadear a reabsorção de Ca^{2+} a nível do túbulo distal e por outro lado, vai aumentar a actividade dos osteoclastos, induzindo a reabsorção óssea que se reflecte numa elevação do cálcio sérico. Como o rim não consegue responder à PTH, não consegue reabsorver o Ca^{2+} nem excretar o fosfato. Há, portanto, hipocalcémia e hiperfosfatémia que vão conduzir à produção de ainda mais PTH, causando assim o hiperparatiroidismo secundário. (Filho & Melamed, 2013)

No que diz respeito ao hemograma, verifica-se a presença de uma anemia normocítica normocrómica. A eritropoietina é uma hormona sintetizada no rim que estimula a eritropoiese e, por isso, a produção de eritrócitos. Assim, a baixa contagem de eritrócitos e a baixa concentração de hemoglobina advêm da deficiência da capacidade de síntese de eritropoietina no rim. Por outro lado, há outros factores inerentes da insuficiência renal crónica (IRC) que potenciam a anemia nestes doentes. A IRC sendo um processo inflamatório, desencadeia a produção hepática de hepcidina, que é um peptídeo que inibe a absorção duodenal do ferro e a mobilização do ferro das células do sistema reticuloendotelial. Desta forma, o ferro não consegue ser utilizado para a síntese de hemoglobina e fica retido no interior das células. Além disso, são produzidas citocinas pró-inflamatórias como a Interleucina-6 e o factor de necrose tumoral alfa que vão estimular a síntese de mais hepcidina e induzir a apoptose das células eritróides, respectivamente. (Malyszko & Mysliwiec , 2007)

Diante um processo inflamatório, a ferritina encontra-se aumentada e a transferrina diminuída. O facto da transferrina estar diminuída, justifica a capacidade total de fixação do ferro (TIBC) estar também diminuída, uma vez que esta reflecte a capacidade da transferrina ligar-se ao ferro. (Malyszko & Mysliwiec , 2007)

Na IRC a taxa de filtração glomerular está diminuída, havendo por isso, retenção de ureia e creatinina, que apenas são eliminados por filtração glomerular. (Graw, Murphy, Srivastava, Cowan, & O'Relly, 2014)

8.2. Anemia ferropriva

Este caso clínico é de um homem de 66 anos que deu entrada nas urgências com um estado de anemia grave. Foram realizadas análises no soro e no sangue total. Os resultados encontram-se na **Tabela X**.

Tabela X- Resultados laboratoriais obtidos.

Parâmetros	Resultado	Valores de referência	Unidades
ERITROGRAMA			
Eritrócitos	3.82	4.50 – 5.00	10 ¹² /L
Hemoglobina	6.8	13.5 – 17.5	g/dL
Hematócrito	23.5	41 – 53	%
VCM	62	80 – 100	fL
HCM	18	26 – 34	pg
CHCM	29	32 – 36	g/dL
RDW	18.7	11.6 – 14.0	%
BIOQUÍMICA			
Ferro sérico	10	65 – 175	µg/dL
Ferritina	6.0	20.0 – 250.0	µg/dL
TIBC	435	250 – 425	
Saturação da Transferrina	2	20 - 50	%

Adaptado de boletim clínico obtido no Laboratório de Análises Clínicas SYNLAB Madeira.

A partir do hemograma, observa-se nitidamente uma anemia microcítica hipocrômica, uma vez que apresenta valores de hemoglobina, VCM e CHCM abaixo dos valores de referência. Posto isto, foi realizado um esfregaço de sangue periférico, a fim de confirmar estas alterações morfológicas na série eritrocitária. A **Figura 14** ilustra o esfregaço sanguíneo observado.

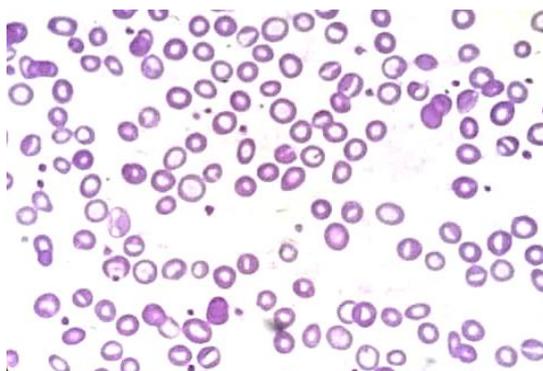


Figura 14- Estudo morfológico do sangue periférico. Ampliação 100x. (Fotografado no LACSM)
Observa-se uma hipocromia marcada e anisocitose.

Este esfregaço confirma a hipocromia acusada no hemograma. Observa-se ainda uma heterogeneidade no tamanho dos eritrócitos e que está de acordo com o valor de RDW.

Uma anemia microcítica hipocrômica pode surgir em diversas ocasiões como: anemias sideroblásticas, deficiência de ferro, talassémias e na anemia da doença crónica. Para que se saiba a causa subjacente a esta anemia, é necessário recorrer aos testes complementares realizados na Bioquímica. Como a anemia por deficiência de ferro é a principal causa das anemias microcíticas hipocrômicas, começa-se por estudar os parâmetros associados ao metabolismo do ferro, nomeadamente: ferro sérico, ferritina, TIBC e a saturação de transferrina. O ferro sérico corresponde ao ferro que se encontra ligado à transferrina na corrente sanguínea; a ferritina é a proteína de armazenamento do ferro nas células; a transferrina é a proteína que transporta o ferro na corrente sanguínea.

O valor baixo da ferritina exclui a hipótese de se tratar de uma anemia da doença crónica. Neste tipo de anemias, o ferro fica retido no interior das células e por isso a ferritina teria de estar elevada e a TIBC estaria diminuída, uma vez que a transferrina é uma proteína de fase aguda negativa. Também se pode descartar a possibilidade de se tratar de uma anemia sideroblástica ou de uma talassémia, visto que o ferro sérico está diminuído. A TIBC aumentada juntamente com a saturação da transferrina baixa é altamente indicativa de anemia por deficiência de ferro. Assim, pode-se concluir que de facto estamos perante uma anemia ferropriva. O próximo passo assentará no estudo da possível etiologia da deficiência de ferro.

8.3. Pé diabético

Este caso clínico advém de um homem com 64 anos que se encontrava internado na sequência de uma infecção no pé diabético. Foram analisados o soro, o sangue total e um exsudado purulento da ferida.

Na **Tabela XI** encontra-se representado os resultados analíticos do soro e do sangue total.

Tabela XI- Resultados laboratoriais obtidos.

Parâmetro	Resultado	Valores de referência	Unidades
HEMATOLOGIA			
Eritrócitos	3.30	4.00 – 5.20	$\times 10^{12}/L$
Hemoglobina	9.6	12.0 – 16.0	g/dL
Hematócrito	31.0	41.0 – 53.0	%
Leucócitos	23.27	4.00 – 10.00	$\times 10^9/L$
Neutrófilos	21.04	1.80 – 7.00	%
Linfócitos	1.00	1.00 – 4.00	%
Monócitos	1.05	0.20 – 1.00	%
Plaquetas	306	150 – 400	$\times 10^9/L$
BIOQUÍMICA			
Glucose	306	74 – 106	mg/dL
Ureia	34	19 – 49	mg/dL
Creatinina	1.02	0.70 – 1.30	mg/dL
AST	15	< 34	UI/L
ALT	16	10-49	UI/L
Fosfatase alcalina	303	46 – 116	UI/L
GGT	38	< 73	UI/L
PCR	196.0	< 5.0	mg/L

Adaptado de boletim clínico obtido no Laboratório de Análises Clínicas SYNLAB Madeira.

Atendendo ao boletim clínico, observa-se uma neutrofilia concordante com a infecção. Quer a concentração da hemoglobina quer a contagem de eritrócitos, estão abaixo do limite de referência devido ao processo inflamatório desencadeado pela infecção. Na sua sequência, obtém-se um hematócrito também diminuído, uma vez que este representa a percentagem de volume ocupado pelos eritrócitos em um volume de sangue total.

O aumento da concentração da fosfatase alcalina está geralmente associado aos distúrbios hepáticos à nível dos canalículos biliares, ou então ao aumento da actividade dos osteoclastos para o *turnover* do osso. Pode-se descartar a hipótese de estar relacionado com o fígado, uma vez que as enzimas hepáticas, sobretudo a GGT, estão dentro dos valores de referência. Numa situação onde houvesse alguma lesão dos canalículos biliares, teríamos um aumento da GGT que é um biomarcador local do mesmo. Possivelmente estará associado ao osso e precisaríamos de outros parâmetros como o cálcio e a PTH para entendermos melhor este aumento.

No que diz respeito ao exsudado purulento da ferida, semeou-se em geloses de sangue, chocolate, Chapman, MacConkey, Saboraud e BHI. No dia seguinte obteve-se os resultados apresentados na **Figura 15**.

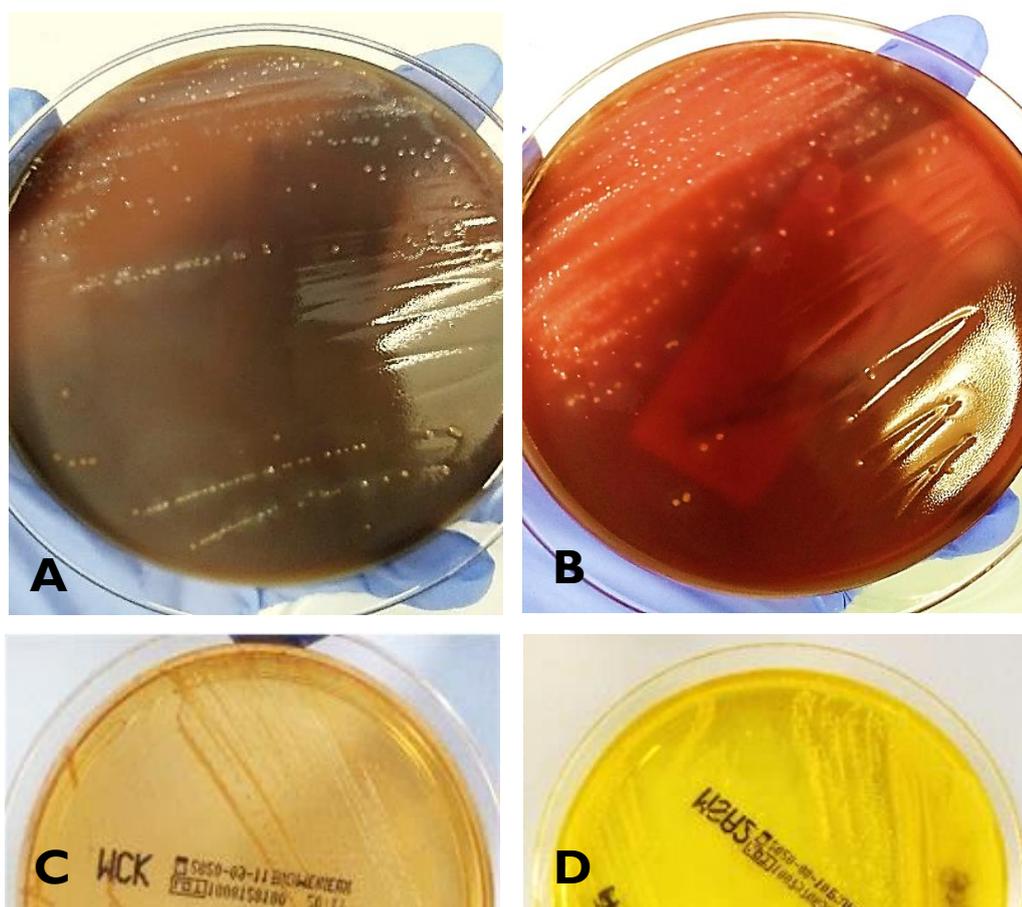


Figura 15- Resultado do exame cultural. A) Colónias no meio de Chocolate; B) Colónias na gelose de sangue; C) Colónias no meio MacConkey; D) Colónias no meio de Chapman. (Fotografado do LACSM)

Analisando as culturas, podemos dizer que à partida estamos perante uma infecção por *Staphylococcus aureus*, já que o meio Chapman apresenta colónias amarelas características

deste microrganismo, que além de serem halotolerantes fermentam o manitol. Por outro lado, também se obteve crescimento no meio MacConkey, meio selectivo para bactérias de Gram-negativo. Da análise deste meio apenas podemos deduzir que se trata de uma bactéria de Gram-negativo que não fermenta lactose, mas que pelo odor desagradável e pelo aspecto das colónias, poderíamos excluir a hipótese de se tratar de *Pseudomonas*. Atendendo à gelose de sangue e à de chocolate, é possível detectar o característico *swarming* do género *Proteus*, de tal forma que cobriu as colónias de *S.aureus*, não sendo de todo possível identificar a sua β -hemólise. Este *swarming* não se verifica no meio MacConkey devido a sua concentração em sais biliares. (Hernandez, Ramisse, & Cavallo, 1999) nem no Chapman porque o crescimento desta bactéria é inibido pela concentração de 7,5% de NaCl que compõe este meio.

Como diagnóstico final, fez-se o antibiograma e a identificação no VITEK[®]2 COMPACT. Assim, utilizaram-se as cartas GN e AST-N355 para as colónias oriundas do meio MacConkey, já que suspeitávamos de *Proteus* que é um bacilo de Gram-negativo com oxidase negativa. Da mesma forma, usaram-se as cartas GP e AST-P648 para as colónias provenientes do meio Chapman, uma vez que a nossa suspeita estava fortemente orientada para *S.aureus* que são cocos de Gram-positivo com catalase também positiva.

Obteve-se *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus*. Do antibiograma obtido, validaram-se os antibióticos representados na **Tabela XII**. Esta validação teve em conta o facto da infecção ser uma ferida bem como a susceptibilidade comum de ambos os microrganismos.

Como este *S.aureus* é resistente a Oxacilina, estamos perante um caso de *Staphylococcus aureus* metilina resistente.

Tabela XII- Antibiograma validado.

Microrganismo	Resistente	Susceptível
<i>S.aureus</i>	Benzilpenicilina, Eritromicina, Levofloxacina, Moxifloxacina, Oxacilina	Ácido Fusídico, Clindamicina, Gentamicina, Linezolid, Sulfametoxazol + Trimetoprim, Vancomicina
<i>P. mirabilis</i>	-----	Amoxicilina + Ácido Clavulânico, Ampicilina, Cefuroxima, Cefuroxima Axetil, Ciprofloxacina, Gentamicina, Piperacilina + Tazobactam, Trimetoprim + Sulfametoxazol

8.4. Candidúria

Chegou ao laboratório uma urina asséptica de um homem de 47 anos. Foi realizada a urocultura no meio CLED, na qual obteve-se o resultado representado na **Figura 16A**.

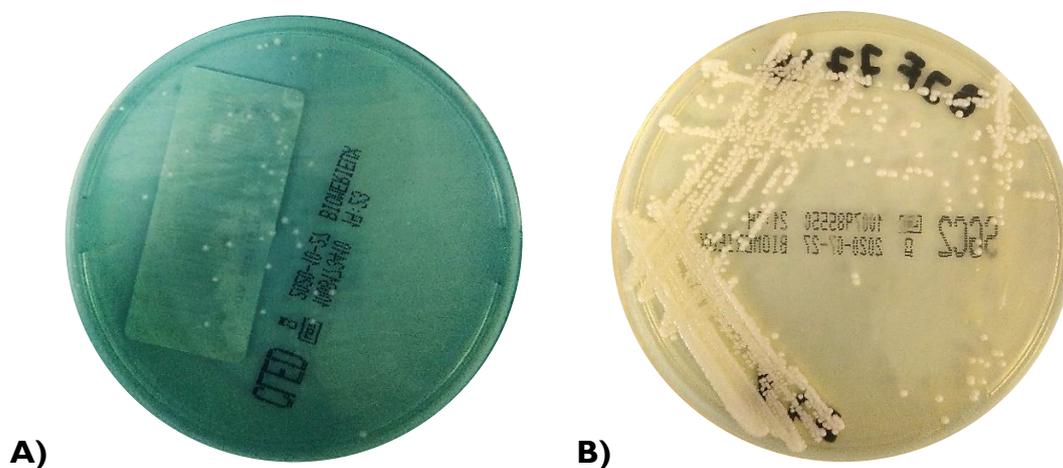


Figura 16- Resultado da urocultura. A) Urocultura primária no meio CLED; B) Repicagem da colónia no meio Saboraud. (Fotografado do LACSM)

Esta urina tinha sido dada como negativa, devido ao insignificante crescimento que apresentou no meio CLED, apesar de estar pura. No entanto, quando se estava a validar os resultados, verificámos que na análise sumária da urina, realizada pelo auto-analisador, tinha sido acusado a presença de muitos leucócitos, o que não é de todo concordante com a situação apresentada. Assim, surge a necessidade de confirmar este resultado com a observação do sedimento urinário ao microscópico.

No sedimento urinário, além de terem sido observados muitos leucócitos, observou-se imensas leveduras. Averiguou-se o processo deste doente e verificou-se que se tratava de uma pesquisa orientada, o que sugere que esta pessoa apresentava sintomatologia clínica para uma infecção urinária. Embora a contagem de colónias obtidas na cultura primária seja bastante reduzida, há que ter em conta que se trata do meio CLED, que não é um meio propício para o crescimento de leveduras. Se a cultura primária da urina tivesse sido executada no meio Saboraud, provavelmente teríamos uma contagem 10^6 , tendo em conta a quantidade de leveduras que se viu no sedimento urinário ao microscópio. Posto isto, repicou-se esta colónia para o meio Saboraud (**Figura 16B**) e levou-se à estufa $37^{\circ}\text{C}/24\text{h}$, para que no dia seguinte se realizasse a identificação da levedura, utilizando a carta YST no VITEK[®] 2. Identificou-se *Candida tropicalis*, que é uma das espécies de fungos mais isoladas nas infecções urinárias, associadas essencialmente às pessoas imunodeprimidas e diabéticas.

9. Conclusão

Este estágio constituiu uma das experiências mais enriquecedoras da minha vida. Não só porque desenvolvi competências técnico-científicas, mas porque também desenvolvi as minhas competências sociais e humanas. Integrar-me em ambientes novos sempre foi um desafio pessoal. No entanto, fui bem acolhida por toda a equipa SYNLAB do HPM, que soube lidar com a minha personalidade e que me envolveu em todas as fases da rotina laboratorial. Como permitiam que eu fizesse as coisas sozinha, deparei-me com algumas dificuldades e aprendi a ultrapassá-las, que de outra forma e apenas observando eu não aprenderia.

Nas primeiras semanas de estágio, confesso que me senti um pouco perdida porque não houve um plano específico, nem por parte da faculdade nem por parte do laboratório, que me fizesse entender no que deveria me focar. Nunca tinha estado num laboratório de Análises Clínicas e de um momento para outro, lá estava eu defronte de uma realidade que nunca me foi explicada na universidade e que também não consta de todo nos manuais. Roma não se fez num dia, e aprender a gerir toda a informação que corre no laboratório, também não.

O Mestrado em Análises Clínicas na FFUC fornece-nos todas as ferramentas necessárias para entender as metodologias subjacentes ao processamento das amostras, bem como compreender e validar os resultados obtidos. A valência que me senti mais insegura foi claramente a endocrinologia, porque nem na licenciatura nem no mestrado, tive uma formação sólida nesta área. Na Microbiologia, infelizmente não tive contacto com outros fungos além de *Candida spp.*, e sendo a Micologia a área que menos gosto e que apresento mais fragilidades, este estágio não me deu a oportunidade de superá-las.

Apesar do estágio ter sido interrompido devido ao Estado de Emergência, não me senti prejudicada. Consegui passar por todas as valências e cumprir o tempo de estágio proposto. Além disso, considero que a minha experiência de estágio pós-quarentena foi mais positiva, não só porque o fluxo de trabalho aumentou, mas porque também ingressaram outras pessoas na equipa, igualmente em formação, permitindo-me aprender com elas.

Termino assim este capítulo da minha vida, com mais perguntas do que respostas, mas com a certeza de que fiz sempre o que estava ao meu alcance para cumprir os objectivos propostos.

10. Bibliografia

- AnnBonilla, M., & Menell, J. (2016). Disorders of White Blood Cells. Em P. Lanzkowsky, J. Lipton, & J. Fish, *Lanzkowsky's Manual of Pediatric Hematology and Oncology, Sixth Edition* (pp. 209-238). Elsevier.
- Azadi, D., Motallebirad, T., Ghaffari, K., & Shojaei, H. (2018). Mycobacteriosis and Tuberculosis: Laboratory Diagnosis. *The Open Microbiology Journal*, 41-58.
- Bain, B. (2016). Contagem de plaquetas. Em B. Bain, *Células sanguíneas : um guia prático* (pp. 22-23). Porto Alegre: Artmed.
- Bain, B. (2016). Fixação, coloração e montagem. Em B. Bain, *Células sanguíneas : um guia prático* (pp. 11-13). Porto Alegre: Artmed.
- Bain, B., & Briggs, C. (2017). Basic Haematological Techniques. Em B. Bain, I. Bates, M. Laffan, & M. Lewis, *Dacie and Lewis Practical Haematology* (pp. 18-49). Londres: Elsevier.
- Banfi, G., Salvagno, G., & Lippi, G. (2007). The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 565-576.
- Briggs, C. (2009). Quality counts: new parameters in blood cell counting. *International Journal of Laboratory Hematology*, 277-297.
- Butina, M. (2020). Erythrocyte Production and Destruction. Em E. Keohane, C. Otto, & J. Walenga, *Rodak's Hematology Clinical Principles and Applications* (pp. 62-91). Canada: Elsevier.
- Carson, J. (2016). Clinical Microbiology Procedures Handbook. Em W. a. Cultures, *Wound Cultures* (pp. 3.13.1.1-3.13.2.4.). Washington: ASM Press.
- Coni, E., Marcialis, M., Pintus, M., Irmesi, R., Masile, V., & Fanos, V. (2015). Group B Streptococcal Meningitis: A Description of Six Case Reports. *Int J Clin Pediatr.*, 127-136.
- Costa, B., Vellés, M., Viana, M., Pereira, A., Rocha, S., Rocha, L., & Moreira, V. (2020). Plaquetograma: relato de caso de pseudotrombocitopenia. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 1-4.
- Crobach, M., Planche, T., Eckert, C., Barbut, F., Terveer, E., Dekkers, O., . . . Kuijper, E. (2016). European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology and Infection*, 63-81.
- Dilanchian, P., & Hooton, T. (2016). Diagnosis, Treatment, and Prevention of Urinary Tract Infection. *Microbiology Spectrum*, 1-20.

- Direção-Geral da Saúde. (30 de Setembro de 2011). *Exames laboratoriais na Gravidez de Baixo Risco*. [Acedido a: 12/09/2020]. Disponível na internet: <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0372011-de-30092011-jpg.aspx>
- Direção-Geral da Saúde. (2017). Abordagem Diagnóstica e Terapêutica das Parasitoses em Idade Pediátrica. *Direção-Geral da Saúde*, 1.
- Direção-Geral de Saúde. (2011). *Resíduos Hospitalares*. Obtido de DGS: <https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/residuos-hospitalares-pdf.aspx>
- Direção-Geral de Saúde. (19 de Dezembro de 2014). *Directrizes da DGS*. [Acedido a: 12/09/2020]. Disponível na internet: <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0192014-de-31122014-pdf.aspx>
- Fang, C.-H., Chien, Y.-L., Yang, L.-M., Lu, W.-J., & Lin, M.-F. (2015). EDTA-dependent pseudothrombocytopenia. *Formosan Journal of Surgery*, 107-109.
- Filho, A., & Melamed, M. (2013). Vitamina D e doença renal. O que nós sabemos e o que nós. *Brazilian Journal of Nephrology*, 323-331.
- Fonseca, A., Sebastião, C., Martins, F., Ribeiro, M., Calheiros, I., Lito, L., . . . Bento, R. (2004). *Orientações para a elaboração de um Manual de Boas Práticas em Bacteriologia*. [Acedido a: 10/08/2020]. Disponível na internet: <https://www.dgs.pt/programa-nacional-de-controlo-da-infeccao/documentos/manuais-de-boas-praticas/orientacoes-para-a-elaboracao-de-um-manual-de-boas-praticas-em-bacteriologia-pdf.aspx>
- Genova, B., & Tonelli, R. (2016). Infection Strategies of Intestinal Parasite Pathogens and Host Cell Responses. *Frontiers in Microbiology*, 1-16.
- Gergova, R., Strateva, T., & Mitov, I. (2013). Gardnerella vaginalis-associated bacterial vaginosis in Bulgarian women. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 1-6.
- Ghiaur, G., & Jones, R. (2019). Hematopoiesis. Em H. Lazarus, & A. Schmaier, *Concise Guide to Hematology* (pp. 5-15). Switzerland: Springer.
- Grants, J., Wegrzyn, J., Hui, T., O'Neill, K., Shadbolt, M., Knapp, D., . . . Karsan, A. (21 de Maio de 2020). Altered microRNA expression links IL6 and TNF-induced inflammaging with myeloid malignancy in humans and mice. *HEMATOPOIESIS AND STEM CELLS*, 2235-2251. [Acedido a: 14/09/2020]. Disponível na internet: <https://www.bcgsc.ca/news/aging-associated-inflammation-driver-myeloid-malignancies>
- Graw, A., Murphy, M., Srivastava, R., Cowan, R., & O'Reilly, D. (2014). Bioquímica Clínica. Em A. Graw, M. Murphy, R. Srivastava, R. Cowan, & D. O'Reilly, *Bioquímica Clínica* (pp. 26-33). Reino Unido: Elsevier.

- Gupta, R., Talwar, G., & Gupta, S. (1992). Rapid antibody capture assay for. *Journal of Immunoassay*, 441-445.
- Haque, R. (2007). Human Intestinal Parasites. *Journal of Health, Population and Nutrition*, 387-391.
- Hernandez, E., Ramisse, F., & Cavallo, J. (1999). Abolition of Swarming of Proteus. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOG*, 3435.
- Hoffbrand, A. V., & Moss, P. (2017). Plaquetas, coagulação e hemostasia. Em A. V. Hoffbrand, & P. Moss, *Fundamentos em Hematologia de Hoffbrand* (pp. 264-278). Porto Alegre: Artmed.
- Hoffbrand, A. V., & Moss, P. (2018). Essential haematology. Em A. V. Hoffbrand, & P. Moss, *Fundamentos em Hematologia de Hoffbrand* (p. 270). Porto Alegre: Artmed.
- Hoffbrand, A. V., & Moss, P. (2018). Fundamentos em Hematologia de Hoffbrand. Em A. V. Hoffbrand, & P. Moss, *Fundamentos em Hematologia de Hoffbrand* (pp. 1-11). Porto Alegre: Artmed.
- Izetbegovic, S. (2013). Occurrence of ABO And RhD Incompatibility. *Mater Sociomed*, 255-258.
- Keohane, E., Otto, C., & Walenga, J. (2020). Examination of the Peripheral Blood Film and Correlation With the Complete Blood Count. Em E. Keohane, C. Otto, & J. Walenga, *Rodak's Hematology Clinical Principles and Applications* (p. 203). Missouri: Elsevier.
- Khandekar, M., Khurana, A., Katdare, A., Inamdar, A., Kakrani, A., & Deshmukh, S. (2006). Platelet volume indices in patients with coronary artery disease and acute myocardial infarction: an Indian scenario. *Journal of clinical pathology*, 146-149.
- Kint, N., Feliciano, C. A., Martins, M., Morvan, C., Fernandes, S., Folgosa, F., . . . Martin-Verstraete, I. (8 de Setembro de 2020). Molecular Biology and Physiology. *How the Anaerobic Enteropathogen Clostridioides difficile Tolerates Low O₂ Tensions*, pp. 1-17.
- Kuypers, J. (2020). Impact of Rapid Molecular Detection of Respiratory Viruses on clinical outcomes and patient management. *Journal of Clinical Microbiology*, 1-6.
- Laffan, M., & Manning, R. (2017). Investigation of Haemostasis. Em B. Bain, I. Bates, M. Laffan, & M. Lewis, *Dacie and Lewis Practical Haematology* (pp. 379-382). Reino Unido: Elsevier.
- Laffan, M., & Manning, R. (2017). Investigation of Haemostasis. Em B. Bain, I. Bates, M. Laffan, & M. Lewis, *Dacie and Lewis Practical Haematology* (pp. 381-383). Reino Unido: Elsevier.
- Laffan, M., & Manning, R. (2017). Investigation of Haemostasis. Em B. Bain, I. Bates, M. Laffan, & M. Lewis, *Dacie and Lewis Practical Haematology* (pp. 369-377). Reino Unido: Elsevier.

- Lapierre, Y., Rigal, D., Adam, J., Josef, D., MeyerF, Greber, S., & Drot, C. (1990). The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody. *Transfusion*, 109-113.
- Ligozzi, M., Bernini, C., Bonora, M., De Fatima, M., Zuliani, J., & Fontana, R. (2002). Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci. *J Clin Microbiol*, 1681-1686.
- Livermore, D. M., Struelens, M., Amorim, J., Baquero, F., Bille, J., Canton, R., . . . Visser, M. R. (2002). Multicentre evaluation of the VITEK 2 Advanced Expert System for interpretive reading of antimicrobial resistance tests. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 289–300.
- Lorian, V. (2005). *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Mahon, C., & Lehman, D. (2019). Host-Parasite Interaction. Em C. Mahon, & D. Lehman, *Textbook of Diagnostic Microbiology* (pp. 30-31). Missouri: Elsevier.
- Mahon, C., & Lehman, D. (2019). Infections of the Orbit. Em C. Mahon, & D. Lehman, *Textbook of Diagnostic Microbiology* (p. 964). Missouri: Elsevier.
- Mahon, C., & Lehman, D. (2019). Laboratory Identification of Significant Isolates. Em C. Mahon, & D. Lehman, *Textbook of Diagnostic Microbiology* (p. 324). Missouri: Elsevier.
- Malyszko, J., & Mysliwiec, M. (2007). Hcpidin in Anemia and Inflammation in Chronic Kidney Disease. *Kidney Blood Pressure Research*, 15-30.
- Mclellan, L., & Hunstad, D. (2016). Urinary Tract Infection: Pathogenesis and Outlook. Em L. Mclellan, & D. Hunstad, *Urinary Tract Infection: Pathogenesis and Outlook* (pp. 946-957). Elsevier .
- Millner, R., & Becknell, B. (2019). Urinary Tract Infections. *Pediatric Clinics of North America*, 1-13.
- Mirza, K. (2020). Hematopoiesis. Em E. Keohane, C. Otto, & J. Walenga, *Rodak's Hematology Clinical Principles and Applications* (pp. 43-62). Canada: Elsevier.
- Mitra, R., Mishra, N., & Rath, G. (2014). Blood groups systems. *Indian Journal of anaesthesia*, 524-528.
- Muzny, C., Taylor, C., Swords, E., Tamhane, A., Chattopadhyay, D., Cerca, N., & Schwebke, J. (2019). An Updated Conceptual Model on the Pathogenesis of Bacterial Vaginosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 1-7.
- Negrinho, A., Ferreira, B., Serrano, D., Ribeiro, E., & Shone, S. (2019). Prevalência da colonização nasal por *Staphylococcus Aureus* resistente àmetilina nos técnicos de análises clínicas e saúde pública num hospital do distrito de Lisboa: estudo de caso. *SAÚDE & TECNOLOGIA*, 34-41.

- Osei-Bimpong, A., & Burthem, J. (2017). Supplementary Techniques Including Blood Parasite Diagnosis. Em B. Bain, I. Bates, M. Laffan, & M. Lewis, *Dacie and Lewis Practical Haematology* (pp. 93-110). China: Elsevier.
- Papp, J., Schachter, J., Gaydos, C., & Pol, B. (14 de Março de 2014). *Recommendations for the Laboratory-Based Detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae — 2014*. [Acedido a: 12/09/2020]. Disponível na internet: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr6302a1.htm>
- Perry, J. (2017). A Decade of Development of Chromogenic Culture Media for Clinical Microbiology in an Era of Molecular Diagnostics. *Clinical Microbiology Reviews*, 449-479.
- Perry, J. (2017). A Decade of Development of Chromogenic Culture Media for Clinical Microbiology in an Era of Molecular Diagnostics. *Clinical Microbiology Reviews*, 449 –479.
- Public Health England. (2018). Staining procedures. *UK Standards for Microbiology Investigations*, 15-16.
- Purkayastha, S., Bhattacharya, M., Prasad, H., Bhattacharjee, M., Mandal, S., Mathipi, V., & Kumar, N. (2020). Probiotic and Cytotoxic Potential of Vaginal Lactobacillus Isolated from Healthy Northeast Indian Women. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 205-212.
- Ribeiro, J., Ferreira, D., Arrabalde, C., Almeida, S., Baldaque, I., & Sousa, H. (2015). Prevalence of adenovirus and rotavirus infection in immunocompromised patients with acute gastroenteritis in Portugal. *World Journal of Virology*, 372-376.
- Rungngu, S., Wahani, A., & Mantik, M. (2016). Reticulocyte hemoglobin equivalent for diagnosing iron deficiency anemia in children. *Paediatrica Indonesiana*, 90-94.
- Sanders, J., Hook, E., Welsh, L., Shepherd, M., & Quinn, T. (1994). Evaluation of an Enzyme Immunoassay for Detection of Chlamydia trachomatis in Urine of Asymptomatic Men. *Journal of Clinical Microbiology*, 24-27.
- Schielk, S., Frosch, M., & Kurzai, O. (2010). virulence determinants involved in differential host niche adaptation of Neisseria meningitidis and Neisseria gonorrhoeae. *Medical Microbiology and Immunology*, 185-196.
- Silva, P. H., Alves, H. B., Comar, S. R., Henneberg, R., Merlin, J. C., & Stinghen, S. T. (2016). Fase analítica: análise morfológica do sangue periférico e sua correlação. Em P. H. Silva, H. B. Alves, S. R. Comar, R. Henneberg, J. C. Merlin, & S. T. Stinghen, *Hematologia Laboratorial: Teoria e Procedimentos* (pp. 69-72). Brasil: Artmed.
- Silva, P. H., Alves, H. B., Comar, S. R., Henneberg, R., Merlin, J. C., & Stinghen, S. T. (2016). Fase analítica: análise morfológica do sangue periférico e sua correlação com o

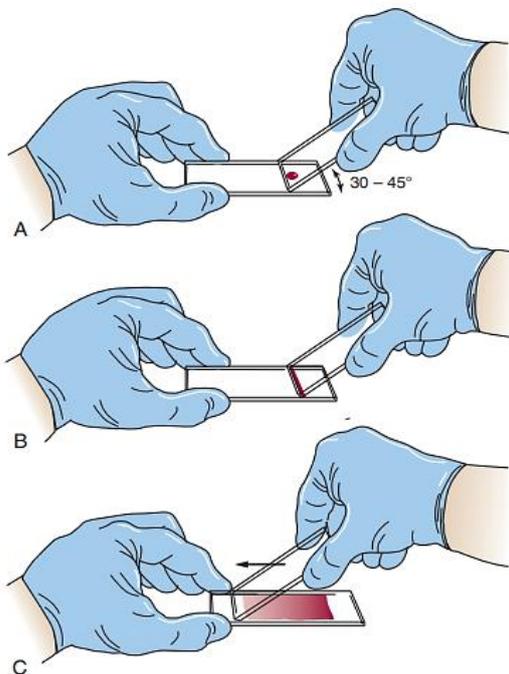
- hemograma . Em P. H. Silva, H. B. Alves, S. R. Comar, R. Henneberg, J. C. Merlin, & S. T. Stinghen, *Hematologia Laboratorial: Teoria e Procedimentos* (pp. 57-60). Brasil: Artmed.
- Silva, P. H., Alves, H. B., Comar, S. R., Henneberg, R., Merlin, J. C., & Stinghen, S. T. (2016). Fase Pré-Analítica em Hematologia Laboratorial. Em P. H. Silva, H. B. Alves, S. R. Comar, R. Henneberg, J. C. Merlin, & S. T. Stinghen, *Hematologia Laboratorial: Teoria e Procedimentos* (pp. 14-15). Brasil: Artmed.
- Smith, A., & Hussey, M. (2005). Gram Stain Protocols. *American Society for Microbiology*, 4.
- Song, W., Yu, Q., Wang, L.-C., & Stein, D. (2020). Adaptation of *Neisseria gonorrhoeae*. *Microbiology Insights*, 1-4.
- Vajpayee, N., Graham, S., & Bem, S. (2017). Basic Examination of Blood and Bone Marrow. Em R. McPherson, & M. Pincus, *Henry's Clinical Diagnosis And Management by Laboratory Methods* (pp. 510-539). St.Louis, Missouri : Elsevier.
- Yu, D., Zheng, Y., & Yang, Y. (2020). Is There Emergence of β -Lactam Antibiotic-Resistant *Streptococcus pyogenes* in China? *Infection and Drug Resistance* , 2323-2327.
- Zaman, Z., Roggeman, S., & Cappelletti, P. (2001). Evaluation of Aution Max AX-4280 Automated Urine Test-Strip Analyser. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 649-656.
- Zimbro, M., & Power, D. (2009). Difco™ & BBL™ Manual: Manual of Microbiological Culture Media. Em M. Zimbro, & D. Power, *Difco™ & BBL™ Manual: Manual of Microbiological Culture Media* (pp. 508-514). EUA: EUA: Becton, Dickinson and Company.
- Zimbro, M., & Power, D. (2009). Difco™ & BBL™ Manual: Manual of Microbiological Culture Media. Em M. Zimbro, & D. Power, *Difco™ & BBL™ Manual: Manual of Microbiological Culture Media* (pp. 144-145). EUA: EUA: Becton, Dickinson and Company.
- Zimbro, M., & Power, D. (2009). Difco™ & BBL™ Manual: Manual of Microbiological Culture Media. Em M. Zimbro, & D. Power, *Difco™ & BBL™ Manual: Manual of Microbiological Culture Media* (pp. 114-118). EUA: EUA: Becton, Dickinson and Company.

II. Anexos

II.1. Anexo I – Técnica para a realização de um esfregaço de sangue periférico.

Tabela XIII- Kit Hemacolor®.

Reagentes	Tempo de imersão (s)
Metanol	10
Eosina Y	10
Azul de metileno	60
Solução tampão (pH 7,2)	5



Procedimento

A) Colocar uma gota de sangue numa das extremidades da lâmina;

B) Aplicar uma segunda lâmina ou lamela, num ângulo de 30 a 45 graus, junto da gota de sangue;

C) Assim que o sangue se espalhe ao longo da borda da lâmina, avançar com a mesma num movimento suave e estável.

Figura 17- Técnica para a realização de um esfregaço de sangue periférico. (Keohane, Otto, & Walenga, 2020)

11.2. Anexo II – Coloração de Gram.

Tabela XIV- Reagentes da coloração de Gram.

Reagentes	Tempo (min)
Cristal violeta	1
Solução de Lugol	1
Álcool-acetona	1
Safranina	1

Procedimento

1. Deixar a lâmina arrefecer, após a execução e fixação do esfregaço;
2. Cobrir a lâmina com cristal violeta, durante 1 minuto;
3. Lavar suavemente com água;
4. Cobrir a lâmina com lugol, durante 1 minuto;
5. Lavar com água;
6. Descorar com álcool-acetona;
7. Lavar e escorrer o excesso de água;
8. Cobrir a lâmina com safranina, durante 1 minuto;
9. Lavar, escorrer e limpar o excesso de água;
10. Deixar a lâmina a secar à temperatura ambiente;
11. Por fim observar o esfregaço com a objectiva de imersão.

(Smith & Hussey, 2005)

11.3. Anexo III – Coloração de Kinyoun.

Tabela XV- Reagentes da coloração de Kinyoun.

Reagentes	Tempo (min)
Carbolfucsina	5
Ácido sulfúrico e álcool etílico	3
Azul de metileno	1

Procedimento

1. Após a realização e fixação do esfregaço, deixar a lâmina arrefecer;
2. Cobrir a lâmina com solução de carbolfucsina, durante 5 minutos;
3. Lavar abundantemente a preparação com água;
4. Cobrir a lâmina com a solução de ácido álcool, durante 3 minutos;
5. Lavar abundantemente com água;
6. Aplicar a solução de azul de metileno, durante 1 minuto;
7. Lavar a preparação com água;
8. Terminar a secagem à temperatura ambiente e observar a lâmina com a objectiva de imersão.

(Public Health England, 2018)