



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Madalena Anjo Silva Gomes

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas,
orientado pela Doutora Susana Isabel Fernandes Pereira
Agostinho e pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte
Matos da Silva e apresentada à Faculdade de Farmácia
da Universidade de Coimbra.

Julho de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Madalena Anjo Silva Gomes

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Dra. Susana Isabel Fernandes Pereira Agostinho e pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos da Silva e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Estágio realizado no SYNLABHEALTH MADEIRA, S.A

Julho de 2022

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, e com um enorme destaque, quero agradecer à melhor pessoa que tenho na vida, ao meu pai! Não poderia ter pedido melhor companhia para nadar neste mar atribulado. Dedico todas as minhas vitórias a ti. Sem ti, nada disto seria possível. Estás sempre lá para amparar as minhas quedas, e para me ajudares a erguer. És um excelente pai, o meu melhor amigo, o meu ombro amigo, o meu porto seguro, e o meu companheiro de aventuras. És, e sempre foste o meu herói. Quero agradecer também à minha mãe e ao meu irmão! Duas pessoas que já tanto lutaram na vida, e que tanto conquistaram. Cada um da sua forma especial e diferente ajudaram mais do que imaginam. Muito obrigada por tudo!

Quero agradecer também à minha restante família, em especial à minha tia Lena, à minha prima/madrinha Carla, à minha prima Maria João e ao meu primo Roberto. Ajudaram-me de mais formas do que poderia sequer imaginar. Sou eternamente grata por toda ajuda que me deram, por toda a disponibilidade, todo o carinho, e pelo quanto contribuíram para o longe de casa não ser tão longe. Muito obrigada por tudo!

Quero agradecer à minha melhor amiga Filipa, pela amizade, pela sorte enorme em poder crescer ao teu lado, pela força que sempre me deste e continuas a dar, por todas as vezes em que ouviste os meus desabafos e destes os conselhos que precisava de ouvir, pelo ombro amigo, pelas gargalhadas, por todas aventuras que tivemos juntas, enfim por tudo.

Quero também agradecer à minha melhor amiga Estela, por seres a irmã mais velha que não tive, por ter tido oportunidade de ter tido a melhor infância ao teu lado, e por apesar de a distância de um oceano continuares a ser um apoio incondicional a todos os níveis.

Quero agradecer também à excelente equipa da SYNLAB da Madeira por me terem recebido de braços abertos, por terem partilhado o vosso carinho e o vosso enorme conhecimento comigo. Em especial quero agradecer à Betania por ter sido um enorme apoio, e por se ter sempre disponibilizado a ajudar, desde o momento que cheguei, e até depois da minha saída. E também quer dar um especial obrigada à Joana pela enorme e constante ajuda.

Por fim, um muito obrigada às minhas orientadoras. À minha orientadora externa, a Dra. Susana Agostinho, pela oportunidade de poder estagiar no seu laboratório, e pela enorme compreensão e disponibilidade, que sempre teve comigo. À minha orientadora interna, a Professora Doutora Ana Miguel por não só ter feito os impossíveis para garantir que eu estagiasse mais próximas de casa, como também pela enorme ajuda, compreensão e disponibilidade que teve comigo para que mais esta etapa fosse concluída. Muito obrigada!

ÍNDICE

I.	ÍNDICE DE FIGURAS	vii
II.	ÍNDICE DE TABELAS	viii
III.	LISTA DE ABREVIATURAS	ix
IV.	RESUMO	xi
V.	ABSTRACT	xi
VI.	INTRODUÇÃO	I
VII.	CARATERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO SYNLAB Madeira	I
	A. FASE PRÉ-ANALÍTICA.....	2
	B. FASE ANALÍTICA.....	3
	C. FASE PÓS ANALÍTICA.....	4
VIII.	CONTROLO DE QUALIDADE	4
	A. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO.....	4
	B. AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE.....	5
IX.	MICROBIOLOGIA	5
	A. PROCESSAMENTO	6
	1. EXAME MICROCÓPICO DIRETO	6
	2. MEIOS DE CULTURA	7
	3. TESTES COMPLEMENTARES DE IDENTIFICAÇÃO.....	8
	4. VITEK®2 COMPACT	9
	B. PRODUTO.....	10
	1. URINA	10
	2. FEZES	13
	3. TECIDOS E EXSUDADOS PURULENTOS DE FERIDAS	18
	4. EXSUDADO URETRAL E VAGINAL	18
	5. EXSUDADO FANRÍNGEO E NASAL.....	24
	6. EXPECTORAÇÕES.....	26
	C. HEMOCULTURAS.....	29
X.	BIOQUÍMICA	30
XI.	IMUNOLOGIA	31
XII.	HEMATOLOGIA	32
	A. Hematopoiese.....	33
	B. Hemograma com contagem de plaquetas.....	34
	1. Eritrograma.....	35
	2. Leucograma.....	38
	3. Plaquetograma.....	39

C.	Esfregaço de Sangue Periférico.....	39
1.	Avaliação da Série Eritrocitária.....	40
2.	Avaliação da Série Leucocitária.....	44
3.	Avaliação da Série Plaquetária.....	46
D.	Velocidade de Sedimentação dos Eritrócitos.....	47
E.	Hemostase.....	48
1.	Testes de <i>screening</i> da coagulação.....	49
XIII.	Casos Clínicos	51
A.	Caso Clínico 1	51
B.	Caso Clínico 2.....	54
XIV.	CONCLUSÃO	59
XV.	REFERÊNCIAS	60
XVI.	ANEXOS.....	71
A.	ANEXO I - Coloração de Gram.....	71
B.	ANEXO II - Coloração de Kinyoun.....	72
C.	ANEXO III - Meios de cultura utilizados no LACSM.....	73
D.	ANEXO IV - Cartas utilizadas no equipamento VITEK®2 COMPACT.....	76
E.	ANEXO V - Equipamentos utilizados na Bioquímica	77
F.	ANEXO VI - Equipamentos utilizados na Imunologia.....	78
G.	ANEXO VII - Técnicas manuais da Serologia	80
H.	ANEXO VIII - Índices Eritrocitários.....	81
I.	ANEXO IX - Características e funções gerais dos diferentes leucócitos.....	82
J.	ANEXO X - Técnica para a realização do esfregaço de sangue periférico	84
K.	ANEXO XI - Características morfológicas e associações clínicas relativas a eritrócitos com diferentes formas.....	85

I. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Urocultura positiva no meio CLED	12
Figura 2 - Urocultura positiva no meio CPSE	12
Figura 3 - Lâmina corada com a técnica de coloração de Gram proveniente de uma amostra de um exsudado uretral.....	20
Figura 4 - Colónias de <i>C. albicans</i> no meio SGC2.....	22
Figura 5 - Colónias de <i>S. agalactiae</i> no meio GRAN.....	24
Figura 6 - Colónias β -hemolíticas no meio COS.....	28
Figura 7 - Diagrama da Hematopoiese.....	34
Figura 8 - Esfregaço de sangue periférico de um indivíduo adulto saudável	41
Figura 9 - Esfregaço de sangue com eritrócitos hipocrómicos	41
Figura 10 - Eritrócito policromático e macrocítico.....	41
Figura 11 - Esfregaços de sangue com macrocitose (A) e microcitose (B).....	42
Figura 12 - Esfregaço de sangue periférico com rouleaux eritrocitário	43
Figura 13 - Esfregaço de sangue periférico com aglutinação Eritrocitária.....	43
Figura 14 - Esfregaço de sangue periférico com a presença de um agregado plaquetar.....	46
Figura 15 - Esfregaço de sangue periférico com satelitismo plaquetário.....	46
Figura 16 - Cascata de coagulação in vivo	49
Figura 17 - Colónias com um centro preto no meio SS.....	53
Figura 18 - Estudo morfológico do sangue periférico.....	57
Figura 19 - Técnica para a realização do esfregaço de sangue periférico.....	84

II. ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios de Murray e Washington	27
Tabela 2 - Alterações numéricas dos leucócitos e possíveis significados clínicos	44
Tabela 3 - Resultados laboratoriais obtidos.	51
Tabela 4 - Resultados Laboratoriais à admissão no serviço de urgências.	54
Tabela 5 - Resultados Laboratoriais obtidos durante o período de internamento.	56
Tabela 6 - Reagentes da coloração de Gram.	71
Tabela 7 - Reagentes da coloração de Kinyoun.	72
Tabela 8 - Meios de cultura, utilizados no LACSM, da bioMérieux (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, França) e respectivas características gerais.....	73
Tabela 9 - Cartas utilizadas no equipamento VITEK®2 COMPACT e a sua finalidade,	76
Tabela 10 - Equipamentos utilizados na Bioquímica, e respetiva metodologia e parâmetros avaliados.....	77
Tabela 11 - Equipamentos utilizados na Imunologia, e respetiva metodologia e parâmetros avaliados.....	78
Tabela 12 - Técnicas manuais na serologia.....	80
Tabela 13 - Índices eritrocitários e respetivo cálculo e significado clínico	81
Tabela 14 - Características e funções gerais dos diferentes leucócitos	82
Tabela 15 - Kit Hematolor®	84
Tabela 16 - Características morfológicas e associações clínicas relativas a eritrócitos com diferentes formas (poiquilocitose).....	85

III. LISTA DE ABREVIATURAS

ADN - Ácido Desoxirribonucleico
ALT - Alanina aminotransaminase
aPTT - Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada
AST- Aspartato aminotransaminase
BAAR - bacilos ácido-ácool resistentes
BHI-T - Brain-Heart Infusion Broth
CAM - Gelose *Campyloset*
CHGM - Concentração de Hemoglobina Globular Média
CLED - Cistina Lactose Deficiente em Eletrólitos
CMI - Concentração Mínima Inibitória
COS - Columbia agar + 5% *sheep blood*
CPSE - *ChromID™ CPS® Elite*
DGS - Direção-Geral da Saúde
EDTA - Etilenodiamino Tetra-acético
EUCAST - *European Commitee on Antimicrobial Suscetibility Testing*
FOB - Fecal Occult Blood
GDH - Glutamato Desidrogenase
GRAN - Gelose de *Granada*
Hb - Concentração de hemoglobina
HCT - Hematócrito
HGM - Hemoglobina Globular Média
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
INR - Razão Internacional Normalizada
INSA - Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
ISI - Índice de Sensibilidade Internacional
ITU - Infecção do Trato Urinário
LACSM - Laboratório de Análises Clínicas SYNLABHEALTH MADEIRA, S.A.
LCR - Líquido Cefalorraquidiano
LDH - Lactato desidrogenase
MCK - Gelose *MacConkey*
MRSA - *Methicilin-Resistant S.aureus*
MSA2 - *Mannitol Salt 2 Agar*
NEQAS - *National External Quality Assessment Scheme*

OMS - Organização Mundial de Saúde
PBP2a - *Penicillin-Binding Protein 2a*
PCR - Proteína C reativa
PCT - Plaquetócrito
PDW - Platelet distribution width
PMN - Neutrófilos Polimorfonucleares
PNAEQ - Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade
PVX - Gelose de agar + *PolyVitex™*
RBC - *Red Blood Cell*
RDW - *Red Cell Distribution Width*
RIQAS - *Randox International Quality Assessment Scheme*
RNA - Ácido ribonucleico
SCCmec - *Staphylococcal Cassete Chromosome mec*
SEHH - *Sociedad Española de Hematología y Hemoterápida*
SEQC - Sociedad Española de Medicina de Laboratorio
SGC2 - *Sabouraud Gentamicin Chloramphenicol 2*
SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SLS - *Sodium Lauryl Sulfate*
SS - Gelose *Salmonella-Shigella*
TIBC - Capacidade total de ligação do ferro
TP - Tempo de Protrombina
TSA - Testes de Suscetibilidade aos Antimicrobianos
VS - Velocidade de Sedimentação dos Eritrócitos
VGM - Volume Globular Médio
VPM - Volume plaquetário médio

IV. RESUMO

No presente trabalho estão descritos os procedimentos e as técnicas de diagnóstico, as quais tive oportunidade de pôr em prática ou, aprender ao longo do estágio curricular realizado no laboratório SYNLABHEALTH MADEIRA, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas. No decorrer deste estágio tive a oportunidade de trabalhar e adquirir conhecimentos nas valências de Microbiologia, Bioquímica, Imunologia e Hematologia. Deste modo, este relatório aborda as fases pré-analíticas, analíticas e pós analíticas, que decorrem na rotina diária do laboratório, sendo feita uma abordagem mais aprofundada das valências de Microbiologia e Hematologia. São ainda apresentados e discutidos alguns casos clínicos, que procuram reunir os conhecimentos adquiridos tanto no decorrer do estágio, como ao longo de mestrado.

Palavras-Chave: Análises Clínicas; Microbiologia; Hematologia; Metodologias; Casos Clínicos.

V. ABSTRACT

In the present work, I describe the procedures and diagnostics techniques which I had the opportunity to put into practice and to learn from, during the curricular internship carried out in the SYNLABHEALTH MADEIRA laboratory, within the scope of the Master's Degree in Clinical Analyses. During this internship, I had the opportunity to work and acquire knowledge in the areas of Microbiology, Biochemistry, Immunology and Hematology. Thus, this report covers the pre-analytical, analytical and post analytical phases, which take place in the laboratory daily routine, with a more in-depth approach to the areas of Microbiology and Hematology. Some clinical cases are also presented and discussed, which aim to bring together the knowledge acquired, both during the internship and during the Master's degree course.

Keywords: Clinical Analysis; Microbiology; Hematology; Methodology; Clinical Cases.

VI. INTRODUÇÃO

O laboratório de Análises Clínicas tem um papel crucial na garantia da boa qualidade de vida dos indivíduos de todo o mundo. Este possibilita a prevenção e o correto diagnóstico de patologias, garantido que possam ser aplicados os tratamentos adequados, e seja realizada a posterior monitorização e evolução da patologia.

Tive a oportunidade de estagiar no Laboratório de Análises Clínicas SYNLABHEALTH MADEIRA, S.A. (LACSM) desde dezembro de 2021 a maio de 2022. Este estágio possibilitou-me presenciar de perto o trabalho árduo e o conhecimento profundo de um Técnico Superior de Saúde. Além do mais, permitiu-me pôr em prática os conhecimentos teóricos e práticos que adquiri ao longo do meu percurso no Mestrado em Análises Clínicas.

A possibilidade de estar perante a realidade da rotina laboratorial diária foi uma mais-valia na consolidação dos meus conhecimentos, e foi fundamental na aquisição de novos, que de outra forma não seria possível. Deste modo, este relatório tem como objetivo descrever a realidade da rotina de um laboratório de análises clínicas, que passa desde a fase pré-analítica, fase analítica, e pós analítica, bem como a nível do controlo da qualidade interno e externo. Tive a oportunidade de desempenhar atividades nas valências, da Microbiologia, Bioquímica, Imunologia e Hematologia.

Neste relatório é feita uma sucinta caracterização do laboratório onde tive oportunidade de estagiar, bem como uma sucinta descrição da fase pré-analítica e do controlo de qualidade. É feita uma descrição mais aprofundada das valências de Microbiologia e Hematologia, a qual passa por uma descrição das técnicas utilizadas, dos equipamentos e metodologias utilizados, do processamento das amostras e da validação dos resultados. É ainda feita uma sucinta descrição da valência de Bioquímica e Imunologia e das respetivas técnicas, equipamentos, metodologias, e parâmetros analisados. No final do relatório encontra-se a discussão de alguns casos clínicos que foram surgindo durante o período de estágio.

VII. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO SYNLAB Madeira

O LACSM localiza-se no Hospital Particular da Madeira (HPM). A Direção técnica é do cargo da Doutora Susana Agostinho, Farmacêutica Especialista em Análises Clínicas, a qual é acompanhada por uma equipa que integra Técnicos Auxiliares e Administrativos, Técnicos Superiores de Saúde e Técnicos de Análises Clínicas e de Saúde Pública.

As infraestruturas do LACSM consistem nas salas de espera e salas de colheita, no laboratório central, gabinetes administrativos e gabinetes técnicos, salas de reuniões, um

armazém e uma câmara de frio. No laboratório central são realizadas análises nas áreas de Microbiologia, Bioquímica, Imunologia, Endocrinologia e Hematologia. O laboratório presta serviço ao HPM, bem como a vários postos de colheita distribuídos por toda a Ilha da Madeira. Além do mais, possui acordos com várias entidades prestando apoio a empresas no âmbito da medicina do trabalho, a clínicas, a lares e a centros de hemodiálise.

A. FASE PRÉ-ANALÍTICA

A qualidade num laboratório de Análises Clínicas é essencial para o objetivo final de fornecer cuidados de saúde seguros e fiáveis. Para tal, há três fases críticas em todo o processo laboratorial, a fase pré-analítica, a analítica e a pós analítica (Alavi, *et al.*, 2020).

A fase pré-analítica integra todo o processo desde o momento que o utente apresenta a requisição, com os parâmetros a analisar, a confirmação da identificação do utente, a preparação do utente, a colheita das amostras, a triagem, e o acondicionamento e transporte das mesmas. A fase pré-analítica é a fase mais suscetível à ocorrência de erros, dado para alguns dos procedimentos mais críticos ainda não existirem diretrizes aceites internacionalmente, nem existirem medidas de controlo de qualidade disponíveis. Os principais erros que podem ocorrer nesta fase consistem em amostras não identificadas ou incorretamente identificadas, tubos de colheita incorretos, quantidades insuficientes de amostra, amostras hemolisada ou coaguladas. Estes erros podem levar ao inconveniente de pedir ao utente para fazer novas colheitas, podem levar a atrasos de diagnóstico, a tratamentos inadequados, além de reduzirem a confiança do utente no laboratório (Alavi, *et al.*, 2020).

Antes do dia da colheita o utente deve ser corretamente informado sobre as preparações que deve ter previamente ao dia da colheita, como necessidade de jejum ou outras restrições que deva ter para garantir o sucesso da colheita. Também deve ser informado da forma correta e das condições, por exemplo, de higienização, colheita, acondicionamento e transporte das amostras passíveis de serem colhidas pelo utente. E em todo este processo deve ser garantido que o utente entendeu claramente as informações que lhe foram dadas, e caso haja alguma dúvida informar que tem a possibilidade de contactar o laboratório para posteriores esclarecimentos. No dia da colheita são entregues ao enfermeiro ou técnico os produtos biológicos colhidos pelo utente. O enfermeiro ou técnico deve confirmar a identidade do utente, e se realizou a correta preparação para a concretização da colheita, bem como deve questionar sob alguma terapêutica a qual esteja a ser sujeito. No momento da colheita por punção venosa deve ser garantida a assepsia do local, bem como garantir a calma e conforto do utente. É importante respeitar a sequência de preenchimento

dos tubos/frascos a colher, sendo esta de acordo com as orientações da respetiva instituição. Caso haja pedidos de hemocultura, então a ordem deverá ser hemocultura, tubo seco, tubo com citrato de sódio, tubo com heparina, tubo com EDTA e tubo com fluoreto. O tubo seco deve ser sempre em primeiro lugar relativamente aos outros tubos, de modo a evitar contaminações com os anticoagulantes. A cada tubo é atribuído uma etiqueta onde consta um código alfa numérico que identifica o posto de colheita, o utente, a natureza da amostra, e um código de barras que será lido pelo equipamento e fornecerá a informação dos parâmetros a analisar, e de qual utente dizem respeito os resultados obtidos. Após colheita, os tubos são centrifugados, devidamente acondicionadas, e rapidamente transportadas ao laboratório.

No laboratório, as amostras rececionadas podem ser provenientes dos postos de colheita e são transportadas em malas térmicas através de estafetas, ou podem ser oriundas do próprio hospital, e nesse caso chegam através de correio pneumático devidamente acondicionadas. Na triagem é medido e registada a temperatura das malas térmicas, bem como a hora de chegada, o nome do estafeta e respetiva assinatura. Posteriormente, é verificado se vieram todos os produtos e a qualidade dos mesmos. Os processos que não foram previamente integrados são integrados, e é dada a entrada de todos os produtos recebidos no programa informático *Apollo*. Este programa reúne toda a informação relativa a todas as análises realizadas e os cuidados a ter antes e durante a colheita, e também informação das condições de processamentos e armazenamento das amostras. Após dada a entrada dos produtos estes são distribuídos para as respetivas valências, e os produtos que têm que ser enviados para o exterior são separados em alíquotas, e devidamente armazenados até ao momento em que são enviados. Existem amostras que são enviadas para o exterior, dado o laboratório não dispor das metodologias necessárias para determinar certos parâmetros. Estas amostras são enviadas de segunda-feira a quinta-feira, devidamente acondicionadas, para os laboratórios SYNLAB em Lisboa, Porto ou Barcelona, de acordo com as análises requisitadas.

B. FASE ANALÍTICA

Na fase analítica ocorre todo o processamento das amostras. O processamento das amostras apenas é iniciado após a realização da manutenção diária dos equipamentos, e da aceitação dos controlos internos. As amostras processadas em cada valência, a informação das técnicas manuais utilizadas, os equipamentos e suas metodologias, e todos os cuidados associados, que são fundamentais e indispensáveis para a obtenção de resultados corretos e fiáveis, é descrito ao longo deste relatório nas respetivas secções.

C. FASE PÓS ANALÍTICA

Na fase pós-analítica, a validação dos resultados obtidos pelos analisadores é realizada tendo em consideração a coerência dos valores obtidos, e tendo em consideração o historial clínico do utente. A validação biopatológica é efetuada por uma especialista, e esta validação é realizada correlacionando todos os resultados obtidos nas diferentes valências, e sempre tendo em consideração o historial clínico do doente.

O armazenamento e eliminação das amostras é um processo informatizado, e todos os resíduos gerados são corretamente eliminados de acordo com o Despacho n. °242/96 do Ministério da Saúde (Direção-geral da Saúde, 1996).

VIII. CONTROLO DE QUALIDADE

O LACSM tem uma ética de trabalho diário que assegura a máxima qualidade dos serviços prestados, e que permite garantir uma enorme confiança aos seus utentes da precisão e exatidão dos resultados fornecidos. Tal é assegura pelo Controlo de Qualidade Interno (CQI) e pela Avaliação Externa da Qualidade (AEQ).

A. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

O controlo de qualidade interno (CQI) permite ao LACSM avaliar e garantir a fiabilidade dos resultados analíticos dos utentes. Para tal, são processadas amostras controlo, a fim de obter uma média, desvio-padrão e coeficiente de variação, de modo a permitir a construção de um gráfico de Levey-Jennings, que é interpretado segundo as regras de Westgard. Em todos os analisadores são utilizados no mínimo dois níveis de concentração de amostra controlo, em que um representa a concentração do analito em condições fisiológicas e o outro em condições patológicas. A análise das cartas permite verificar se é infringida alguma das regras de Westgard, e se for detetada uma infração permite determinar se o erro é aleatório ou sistemático. Após a análise da causa da situação não conforme é então tomada a ação corretiva, que habitualmente consiste na calibração, substituição de reagentes, manutenção do equipamento, entre outras. Após assegurado que o valor do controlo está de acordo com as regras de Westgard, então inicia-se o processamento das amostras dos utentes.

Para além do controlo da qualidade da fase analítica, diariamente é realizada uma breve reunião de modo a serem determinados se ocorreram não conformidades na fase pré-analítica

e pós-analíticas, e são tomadas ações corretivas sugeridas por toda a equipa técnica e direção técnica, que são depois implementadas após atenta revisão.

B. AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE

A avaliação externa da qualidade (AEQ) permite avaliar a exatidão dos resultados obtidos pelos métodos utilizados no laboratório. Para tal, o LACSM participa em vários programas de AEQ, sendo estes o NEQAS (*National External Quality Assessment Scheme*), *Oneworld Accuracy*, o PNAEQ (Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade), o RIQAS (*Randox International Quality Assessment Scheme*), o SEHH (*Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia*) e o SEQC (*Sociedad Española de Medicina de Laboratorio*).

Nestas avaliações são enviadas amostras ao laboratório, as quais são processadas de igual forma a uma amostra proveniente de um utente. Os resultados obtidos são reportados nos prazos estipulados às respetivas entidades. Posteriormente, é recebido um relatório o qual permite avaliar a exatidão dos resultados obtidos pelo laboratório, bem como permite comparar a performance dos métodos do laboratório com outros laboratórios que participaram no mesmo programa. Com estes resultados é possível determinar a necessidade da implementação de medidas corretivas, com o objetivo final da otimização contínua da qualidade dos resultados fornecidos pelo laboratório.

IX. MICROBIOLOGIA

A valência da microbiologia no laboratório de análises clínicas tem como função a identificação de bactérias, vírus, fungos e parasitas responsáveis por doenças em humanos, auxiliando no diagnóstico e na promoção da melhor terapêutica para os pacientes (Fournier *et al.*, 2013).

No LACSM esta valência encontra-se numa sala individual da qual fazem parte uma câmara de fluxo laminar, dois microscópios óticos, dois frigoríficos (temperatura de funcionamento de 2 a 8°C), dois congeladores (a -20°C ± 3°C), três estufas (uma a 37°C ± 1°C, uma a 25°C ± 1°C e uma a 42°C ± 1°C), uma centrífuga e os analisadores automatizados VITEK®2 COMPACT, BACT/ALERT® e o GeneXpert®.

Durante o período que permaneci nesta valência tive a oportunidade de participar em todo o processamento dos diversos produtos biológicos, tais como, urina, fezes, tecidos e exsudados purulentos de feridas, expetorações, exsudados vaginais, uretrais, nasais e faríngeos, e sangue. O processamento das diferentes amostras depende do produto biológico

em questão, mas de um modo geral, consiste na execução de um exame direto, um exame cultural, e testes complementares com o intuito final da seleção da correta carta para a identificação e realização dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) para o respetivo microrganismo responsável pela patologia, com recurso ao VITEK®2 COMPACT.

A. PROCESSAMENTO

I. EXAME MICROSCÓPICO DIRETO

O exame microscópico direto é um método de execução fácil e célere que auxilia a avaliação da qualidade da amostra, a deteção e valorização de um microrganismo, e a orientação do posterior procedimento laboratorial. Este exame pode ser realizado através de preparações a fresco e/ou após coloração.

O exame direto após coloração no LACSM é tipicamente realizado recorrendo às técnicas de coloração de Gram (**Anexo I**) e de Kinyoun (**Anexo II**).

A técnica de coloração de Gram é uma técnica que permite classificar bactérias com base na sua estrutura celular, assim como a observação do seu tamanho e morfologia. Esta técnica também pode ser utilizada para avaliar a qualidade de uma amostra. A coloração de Gram tem então um papel crucial para uma rápida e presuntiva identificação de um agente infeccioso. Esta técnica divide a maioria das bactérias em dois grandes grupos, de Gram-positivo e de Gram-negativo. A composição e arquitetura da parede celular são os fatores responsáveis pela diferente reação à coloração de Gram. As bactérias de Gram-positivo retêm o corante cristal violeta, enquanto as de Gram-negativo sofrem a posterior descloração por ação do álcool-acetona, adquirindo a cor vermelho ou rosa, em resultado do corante safranina (Leber, 2016).

A técnica de coloração de Kinyoun é uma técnica usada para a pesquisa de bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR). A superfície destas bactérias contém uma parede celular com um alto teor de lípidos, como no caso de *Mycobacterium* spp., no qual o mais abundante é o ácido micólico, razão pela qual estas bactérias não conseguem ser coradas pelas técnicas convencionais. Nesta técnica os BAAR ficam coradas de vermelho, em resultado do corante carbolfucsina. As outras bactérias e o fundo ficam corados de azul, em resultado da descoloração por ação do ácido-álcool e, posterior, retenção do corante azul de metileno (Vasanthakumari, Jagannath & Rajasekaran, 1986).

2. MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura são fundamentais no laboratório de microbiologia. Estes fornecem as condições necessárias para o crescimento, isolamento e identificação dos agentes etiológicos responsáveis por diferentes patologias.

De um modo geral, os meios podem ser líquidos, sólidos ou semi-sólidos, e podem ser divididos em diferentes categorias, com base nas suas diferentes capacidades em sustentar o crescimento de determinados tipos de microrganismos. Podem ser divididos em: não seletivos, seletivos, eletivos, diferenciais e enriquecidos. Os não seletivos permitem o crescimento da maioria dos microrganismos não fastidiosos. Os seletivos inibem o crescimento de um determinado tipo de microrganismo, dado possuírem na sua constituição substâncias como antimicrobianos, corantes, álcool ou metais pesados. Os eletivos favorecem o crescimento de um grupo de microrganismos durante um período de tempo. Os meios diferenciais dado serem constituídos por substratos para determinadas enzimas e/ou açúcares permitem distinguir grupos de microrganismos presentes no mesmo inóculo. Por fim, os meios de enriquecimento contém fatores que favorecem o crescimento de microrganismos exigentes (Mahon & Lehman, 2019).

No **Anexo III** encontram-se os diferentes meios de cultura utilizados na rotina do LACSM, e as respetivas características gerais.

Após a inoculação dos meios de cultura, estes são incubados em determinadas condições de temperatura, em atmosferas adequadas, e por períodos de incubação adequados ao tipo de microrganismos expectáveis para cada amostra. Tal permite diferenciar os microrganismos tipicamente responsáveis por causar infeção dos que são colonizadores ou contaminantes.

No LACSM, as atmosferas adequadas são asseguradas pelo sistema *GENbag* da *bioMérieux* (*bioMérieux*, Marcy-l'Etoile, França). O *GENbag* é composto por um envelope estanque de plástico, um gerador de atmosfera e uma barra para fechar, permitindo a obtenção da atmosfera pretendida. Para assegurar o crescimento de bactérias exigentes em dióxido de carbono (CO₂) é então usado o *GENbag* CO₂, para as bactérias anaeróbias recorre-se ao *GENbag* anaer, e para assegurar o crescimento das bactérias microaerófilas recorre-se ao *GENbag* microaer.

3. TESTES COMPLEMENTARES DE IDENTIFICAÇÃO

a) TESTE DA CATALASE

A catalase é uma enzima intracelular responsável por decompor o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigénio (O_2). A pesquisa da presença desta enzima em bactérias permite distinguir bactérias catalase positiva, tais como as pertencentes à família *Micrococcaceae*, de bactérias catalase negativa, como as pertencentes à família *Streptococcaceae* (Reiner, 2010).

O teste da catalase consiste em adicionar uma gota de uma solução de peróxido de hidrogénio sobre uma colónia presente numa lâmina, a qual foi previamente transferida recorrendo a uma ansa de plástico. O teste é considerado positivo quando é observado a libertação de bolhas de oxigénio. É de extrema importância ter cuidado na interpretação deste teste quando as colónias são provenientes de meios contendo sangue, pois os eritrócitos presentes no meio contêm catalase, o que pode resultar em falsos positivos (Fonseca, *et al.*, 2004).

b) TESTE DA OXIDASE

A citocromo c oxidase é uma enzima que atua na fase final da cadeia transportadora de eletrões da respiração aeróbia. Esta enzima catalisa a oxidação do citocromo c, que reduz o oxigénio para formar água. Neste teste o reagente dihidroclorato de tetrametil-p-fenilenodiamina é utilizado como doador artificial de eletrões para o citocromo c. Na presença da enzima citocromo c oxidase, o citocromo c num primeiro passo é oxidado, e posteriormente é reduzido por este reagente. Este reagente ao ser oxidado pelo citocromo c, torna-se corado (azul-violeta). O teste é então considerado positivo quando é observado o desenvolvimento da cor azul-violeta. Na realização deste teste a leitura deve ser feita entre os 10 e 60 segundos, e devem ser utilizadas ansas de plástico ou vidro. O uso de ansas de metal pode originar falsos positivos, devido ao óxido de ferro que se forma no flamejamento (Shields & Cathcart, 2010).

Este teste é útil na discriminação de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, que são oxidase negativa, de colónias de *Pseudomona* spp., *Campylobacter* spp. e *Neisseria* spp (Mahon & Lehman, 2019).

4. VITEK®2 COMPACT

No LACSM é utilizado o equipamento automatizado VITEK®2 Compact (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, França), com o intuito de facilitar e reduzir o tempo de processamento necessário para a identificação de um microrganismo responsável pela patologia, e respetiva obtenção do antibiograma (Mahon & Lehman, 2019).

O equipamento VITEK®2 Compact usa cartas compactas de plástico com vários poços os quais possuem substratos bioquímicos, no caso das cartas de identificação, e antibióticos com concentrações conhecidas, no caso das cartas de antibiograma (Jorgensen & Ferraro, 2009; Pincus, et al., 2006). A escolha das cartas de identificação e de antibiograma é feita de acordo com os resultados obtidos no exame cultural, no exame microscópico direto após coloração com a técnica de coloração de Gram, e de acordo com os testes complementares de identificação. As cartas de identificação e cartas de antibiograma disponíveis no LACSM, e a sua finalidade, encontram-se no **Anexo IV**.

As suspensões de microrganismos a utilizar neste equipamento são preparadas a partir de culturas puras, das quais as colónias são transferidas para um tubo de plástico incolor, contendo uma solução de cloreto de sódio 0,45%, onde a densidade é ajustada de acordo um padrão de McFarland, recorrendo ao equipamento VITEK®DENSICHEK® (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, França). O tubo de plástico e a respetiva carta são colocados numa cassete, e são inseridos no equipamento. Já dentro do equipamento as cartas são inoculadas automaticamente por vácuo com a suspensão de microrganismos. Posteriormente, as cartas são seladas e incubadas, e é feita uma leitura ótica periódica, realizada por fluorescência, para a monitorização do crescimento microbiano, e por turbidimetria, para a determinação da suscetibilidade antimicrobiana. Após o período de incubação, o equipamento correlaciona os resultados das leituras com os dados presentes na sua base de dados, e identifica o microrganismo em causa e o respetivo antibiograma. O resultado da identificação é expresso sob a forma de probabilidade em percentagem. O antibiograma é determinado a partir dos valores de Concentração Mínima Inibitória (CMI) para cada antibiótico, e é expresso como sendo sensível ou resistente, de acordo com as normas da agência europeia EUCAST (European Committee on Antimicrobial Suscetibility Testing)(Jorgensen & Ferraro, 2009; Mahon & Lehman, 2019 Pincus, et al., 2006).

B. PRODUTO

I. URINA

A urina é normalmente estéril, sendo tal mantido por fatores como a anatomia do trato urinário, o fluxo urinário ao longo do trato urinário, e fatores que inibem ou restringem a capacidade infecciosa dos microrganismos (Drake, *et al.*, 2017).

As infecções do trato urinário (ITU) constituem uma das infecções mais comuns na população humana, sendo que todos os indivíduos são suscetíveis a estas. No entanto, a sua prevalência difere com a idade, género e conforme a predisposição do indivíduo. A incidência das ITU é maior no género feminino do que no masculino, com a exceção de infecções relacionadas com cateteres e em recém-nascidos. Anatomicamente as ITU podem ser divididas em infecções do trato urinário superior e do trato urinário inferior. As ITU do trato superior, a pielonefrite e ureterite, ocorrem tanto no homem como na mulher. As ITU do trato inferior incluem cistite, uretrite, e no caso da mulher também cervicite e vaginite, e no homem prostatite e epididimite. Para além disso, as ITU podem ser sintomáticas ou assintomáticas (Behzadi & Behzadi, 2008).

Os microrganismos conseguem aceder ao trato urinário por via hematogénea, linfática ou ascendente. A via ascendente consiste na principal via de acesso ao trato urinário (Grabe, *et al.*, 2015). O agente etiológico responsável pela maioria das UTI é a *Escherichia coli* uropatogénica seguida de *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida* spp, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* spp. e *Enterobacter* spp (Grabe, *et al.*, 2015; Behzadi & Behzadi, 2008).

a) UROCULTURA

A urocultura consiste na identificação e quantificação dos microrganismos presentes na urina e na análise sumária da urina (Urina tipo II).

Para a realização da urocultura é fundamental que o indivíduo faça uma correta colheita de urina e transporte da mesma. A amostra consiste na primeira urina da manhã, sendo necessária uma correta higienização das mãos e da área genital antes da colheita da mesma. O primeiro jato de urina é desprezado, sendo o jato intermédio colhido para um contentor estéril. A urina deve ser armazenada e transportada adequadamente permitindo a obtenção de resultados fiáveis (Pichutti, de Avó & Germano, 2021).

(1) ANÁLISE SUMÁRIA DA URINA

A análise sumária da urina consiste no exame físico, químico e microscópico da urina, permitindo o rastreio de bacteriúria assintomática, hematuria e/ou proteinúria. Vários são os parâmetros analisados, tais como, cor, densidade, pH, a presença de proteínas, glucose, corpos cetónicos, urobilinogénio, bilirrubina, nitritos, hemoglobina e leucócitos (Mota & Beça, 2013).

No LACSM os parâmetros previamente referidos são analisados no equipamento automatizado *AUTION MAX-4280*, no qual as amostras de urina são pipetadas em tiras de papel impregnadas de reagentes. O método de deteção das alterações nas cores nas tiras papel consiste em refletância por duplo comprimento de onda. Já a densidade, cor e a turvação são detetadas por refratometria, refletância e dispersão da luz, respetivamente (Zaman, *et al.*, 2001) A observação microscópica do sedimento urinário é realizada em amostras que venham em contexto de urgência ou quando o equipamento deteta a presença de leucócitos, hemoglobina e proteínas, sendo necessária a sua confirmação. Para tal são centrifugadas, de preferência, cerca de 10 mL de urina a 1500 r.p.m durante 10 minutos, sucedendo-se a sua observação entre uma lâmina e lamela ao microscópio ótico, no qual devem ser visualizados, pelo menos, 5 campos com uma ampliação de 40x, e quantificados os elementos encontrados.

(2) CRESCIMENTO BACTERIANO EM CULTURA

A cultura da urina no LACSM é feita no meio Cistina-Lactose-Deficiente em Eletrólitos (CLED), excepto nas amostras sinalizadas como urgentes as quais são inoculadas no meio *ChromID™ CPS® Elite* (CPSE). A inoculação é realizada utilizando uma ansa calibrada de 10 µL. O meio é incubado na estufa a 37°C ±1°C durante 18 a 24 horas, e posteriormente procede-se à quantificação e identificação presuntiva das colónias.

O meio CLED é usado na rotina laboratorial como um meio não seletivo e diferencial, o qual permite o crescimento da maioria dos agentes etiológicos responsáveis pelas ITU, devido à inclusão de cisteína (Muñoz, *et al.*, 1992). Na constituição deste meio também está presente o azul de bromotimol, que é usado como indicador de pH permitindo a diferenciação de microorganismos fermentadores de lactose dos não fermentadores de lactose. Tal é possível, pois os microorganismos fermentadores de lactose ao utilizarem esta como fonte de energia têm como consequência a diminuição do pH do meio, o que se traduz na mudança da cor do mesmo de verde para amarelo (**Figura 1**). Adicionalmente, este meio também possui como vantagem o facto de possuir um défice em fontes de eletrólitos, o qual restringe o *swarming* observado em colónias do género *Proteus* spp (Zimbro, *et al.*, 2009).

O meio CPSE é um meio cromogénico que permite a identificação presuntiva, o isolamento e a contagem dos microrganismos mais frequentemente responsáveis pelas ITU. Tal como referido para o meio CLED, este meio também possui como vantagem o facto de prevenir o *swarming* observado em colónias do género *Protheus* spp., sendo esta característica conseguida, neste caso, graças à elevada concentração de agar. Além do mais, na constituição deste meio também se encontra presente uma combinação de diferentes peptonas e três substratos cromogéneos, os quais permitem a deteção da atividade de diferentes classes de enzimas especificamente produzidas por determinados microrganismos. As enzimas ao hidrolisarem os substratos cromogéneos têm como consequência a formação de produtos corados, permitindo a fácil identificação dos principais microrganismos responsáveis pelas ITU. Sendo assim, com este meio é possível a fácil identificação de grupos de bactérias, tais como, *E. coli* (**Figura 2**), *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Providencia* e *Morganella* (Raafat, Dwedar & El-Seidi, 2015).

No que respeita à quantificação do crescimento bacteriano, esta é feita em Unidades Formadoras de Colónias por mililitro de urina (UCF/mL). Uma provável infeção pode ser inferida quando se observa o crescimento de um único tipo de colónia com uma concentração > a 10^5 UFC/mL. Uma concentração < a 10^4 UFC/mL pode indicar contaminação uretral ou vaginal. Já uma concentração entre 10^4 e 10^5 UFC/mL necessita de ser avaliada e consultado o historial clínico (Zimbro, et al., 2009).

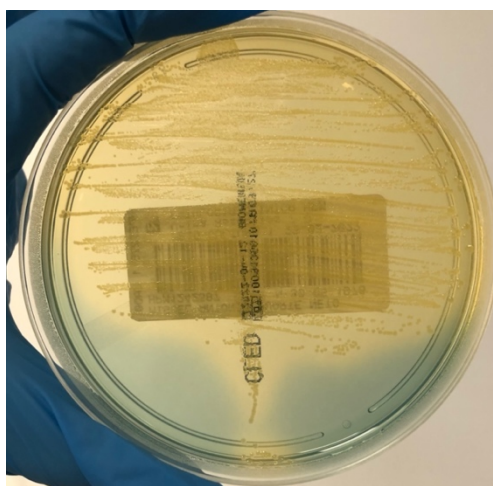


Figura 1 - Urocultura positiva no meio CLED de uma estirpe de *E.coli*, com um crescimento de 10^6 UCF/mL (Fotografia registada no LACSM).

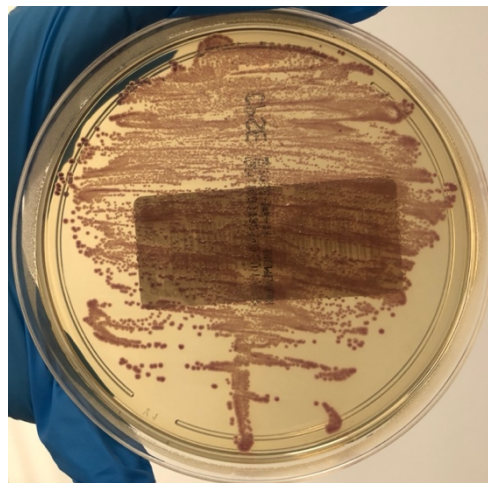


Figura 2 - Urocultura positiva no meio CPSE de uma estirpe de *E.coli*, com um crescimento de 10^6 UCF/mL (Fotografia registada no LACSM).

Por fim, nas uroculturas positivas é realizada a identificação e o antibiograma com recurso ao *VITEK*[®]2 *COMPACT*, excetuando as colónias identificadas como sendo de *E. coli* recorrendo ao meio CPSE, nas quais apenas é obtido o antibiograma.

b) PESQUISA DE *Streptococcus pneumoniae*

A bactéria *Streptococcus pneumoniae* tem sido considerada um dos principais agentes etiológicos de pneumonia adquirida na comunidade. De forma a otimizar a detecção de *S.pneumoniae* em pacientes com suspeita de pneumonia, tem havido um crescente interesse no desenvolvimento de métodos rápidos e de fácil utilização. De tal forma, têm sido desenvolvidos testes imunocromatográficos que permitem a detecção do polissacarídeo C da parede celular pneumocócica que é comum em todas as estirpes de *S.pneumoniae* (Murdoch, et al., 2001).

No LACSM é utilizado o teste imunocromatográfico *BinaxNOW™ Streptococcus pneumoniae Antigen Card* (Abbott Diagnostics Scarborough, Inc., Scarborough, Maine) para a detecção qualitativa do antígeno de *S. pneumoniae* na urina. Este teste é usado como auxílio para o rápido diagnóstico sendo utilizado em conjunto com outros métodos para o correto diagnóstico de pneumonia pneumocócica.

c) PESQUISA DE *Legionella*

A doença dos legionários é uma pneumonia causada pela bactéria *Legionella pneumophila*. Este bacilo gram-negativo encontra-se presente quer na natureza, quer em sistemas artificiais de água. A inalação de aerossóis contendo *L. pneumophila* pode causar doença respiratória, a qual se pode traduzir em pneumonia fatal. A mortalidade desta doença pode ser reduzida com um rápido diagnóstico e uma correta terapia. Testes imunocromatográficos têm auxiliado no diagnóstico presuntivo da doença dos legionários (Badoux, et al., 2020).

No LACSM é utilizado o teste rápido imunocromatográfico *BinaxNOW™ Legionella Antigen Card* (Abbott Diagnostics Scarborough, Inc., Scarborough, Maine) para a detecção qualitativa do antígeno de *L.pneumophila* do serogrupo I na urina. Este teste é usado como auxílio para o rápido diagnóstico sendo utilizado em conjunto com outros métodos para o correto diagnóstico da doença dos legionários.

2. FEZES

As infeções gastrointestinais podem ser causadas por uma grande variedade de agentes infecciosos. A diarreia é o sintoma mais comum em infeções do aparelho gastrointestinal e é uma das principais causas de morte em bebés e crianças em países subdesenvolvidos.

A diarreia caracteriza-se por haver um aumento no volume e em alterações na consistência das fezes, podendo ser categorizada em aguda ou crônica. A diarreia aguda caracteriza-se por ter uma duração inferior a 14 dias e por ser autolimitada, já a diarreia crônica caracteriza-se por ter uma duração superior a 14 dias.

A etiologia e a severidade das infecções gastrointestinais são determinadas por vários fatores epidemiológicos e a existência de fatores predisponentes, tais como, a idade (crianças e idosos são mais predispostos), malnutrição, doenças no sistema imunológico, doenças malignas, terapias imunossupressoras, entre outras. As más condições sanitárias e a ingestão de alimentos e águas contaminadas também são fatores responsáveis por causar diarreia.

A flora normal do trato gastrointestinal, a acidez gástrica, as propriedades antibacterianas do fluido biliar, os movimentos peristálticos do intestino delgado e o próprio sistema imunitário do intestino têm um importante papel na resposta do organismo do hospedeiro à invasão do agente patogénico (Hamer, Gill & Chilengi, 2017).

As infecções no aparelho gastrointestinal são provocadas por um largo espectro de bactérias, parasitas e vírus. De forma a permitir um diagnóstico célere e correto é necessário garantir a viabilidade destes microorganismos, pelo que para tal é fundamental uma adequada colheita e transporte das amostras de fezes (Murray, Rosenthal & Pfaller, 2016).

A cultura de fezes (coprocultura) é o método de escolha para o diagnóstico de infecções intestinais bacterianas, com exceção de infecções causadas por *Clostridium difficile*, cujo diagnóstico pode ser feito pela deteção das toxinas A e B, e infecções causadas por estirpes de *E. coli*, reconhecidas como sendo causadoras de diarreia, que podem ser detetadas por testes moleculares. O diagnóstico das infecções causadas por parasitas passa por um exame microscópico direto de fezes a fresco ou após técnicas de concentração, nos quais é pesquisada a presença de trofozoítos e quistos de protozoários, ou de ovos e larvas de helmintas. Já o diagnóstico das infecções causadas por vírus é feito ou pela deteção do antígeno ou pela deteção de ácidos nucleicos virais (Vila, et al., 2009).

a) COPROCULTURA

Para a realização da coprocultura a colheita de fezes deve ser realizada na fase aguda da doença intestinal e preferencialmente antes de iniciar a terapêutica antibiótica. As fezes devem ser colhidas para um recipiente limpo e seco e transferidas para um recipiente com o meio de transporte apropriado, neste caso, o meio de Cary-Blair modificado. A porção transferida deve ser do tamanho de uma noz e deve conter de preferência pús, muco ou sangue (Fonseca, et al., 2004).

A coprocultura é realizada para despiste de *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e de *Campylobacter* spp. Após chegada ao laboratório a amostra de fezes é inoculada nos meios *Salmonella-Shigella* (SS), *Campyloset* (CAM) e no caldo Selenito. O meio SS e o caldo de selenito são posteriormente incubados na estufa a 37°C durante 18 a 24 horas, já o meio CAM é incubado a 42°C em microaerofilia durante 48 horas.

O meio SS é um meio seletivo e diferencial para *Salmonella* spp. e *Shigella* spp.. A constituição deste meio permite a diferenciação de bactérias fermentadoras das não fermentadoras de lactose, e de bactérias produtoras das não produtoras de sulfureto de hidrogénio (H₂S) (Fonseca, et al., 2004). A presença de colónias incolores com ou sem centro preto é sugestivo da presença de *Salmonella* spp. ou *Shigella* spp. É de referir que na constituição deste meio estão presentes sais biliares e o corante verde brilhante, que permitem a inibição de bactérias Gram-positivas e da grande maioria das *Enterobacteriaceae* que constituem a microbiota intestinal (Zimbro, et al., 2009).

O caldo de selenito é um meio líquido de enriquecimento para *Salmonella* spp.. O selenito de sódio inibe a maioria das *Enterobacteriaceae*, inclusive algumas estirpes de *shigella* spp.. O caldo deve ser repicado ao fim de 8 a 12 horas, dado esse ser o prazo médio de inibição no caldo da maioria dos microorganismos que constituem a microbiota intestinal (Fonseca, et al., 2004).

No LACSM se ao fim de 24 horas não houver crescimento no meio SS de nenhuma colónia sugestiva *Salmonella* spp. ou *Shigella* spp., então é feita a repicagem do caldo para um novo meio de SS a 37°C durante 18 a 24 horas. Após esse período caso não se volte a obter nenhuma cultura sugestiva, então o resultado é dado como negativo. Pelo contrário, se se verificar o crescimento de colónias sugestivas, então é feito a repicagem para o meio *MacConkey* (MCK) com o intuito de obtenção de colónias puras. Este meio é incubado na estufa a 37°C durante 18 a 24 horas. Após este período é feito a identificação e obtenção do antibiograma com recurso ao *VITEK*[®]2 *COMPACT*. Para a confirmação da identificação e obtenção da serotipagem, os meios de cultura com colónia pura são enviados para o Laboratório de Análises Clínicas SYNLAB em Lisboa, e é feita a notificação ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA).

A inoculação no meio CAM, meio seletivo, é realizada para o isolamento de *Campylobacter* spp.. As estirpes de *Campylobacter* spp. consistem em bactérias gram-negativas, microaerofílicas e com um flagelo que confere a mobilidade característica (Perez-Perez, Blaser & Guillermo, 1996).

A composição do meio CAM a presença de agentes antimicrobianos e antifúngicos, bem como as condições de incubação, 42°C em atmosfera microaerofílica durante 48 horas,

são características que inibem a maioria da microbiota intestinal, e por sua vez, favorecem o crescimento das estirpes de *Campylobacter* spp. Neste meio as colónias típicas de *Campylobacter* spp. são de pequenas dimensões e acinzentadas, e por vezes apresentam um aspecto em “chama de vela”, consequente da motilidade característica de *Campylobacter* (Zimbro, et al., 2009). No LACSM, caso sejam observadas colónias sugestivas é realizado o teste da oxidase e é feita a identificação com recurso ao VITEK®2 COMPACT. Para a obtenção do antibiograma, o meio de cultura com colónia pura é enviado para o laboratório SYNLAB em Lisboa, bem como é feita a declaração obrigatória ao INSA.

b) EXAME PARASITOLÓGICO

As parasitoses intestinais são uma causa de infeção gastrointestinal globalmente reconhecida (Wong, et al., 2020). Estas infeções intestinais são predominantemente de transmissão fecal-oral. Em Portugal tem havido uma redução na prevalência destas infeções, em resultado da melhoria das condições higieno-sanitárias. Embora se verifique uma redução na prevalência destas infeções, as que ocorrem devem-se principalmente a *Giardia lamblia* (DGS, 2017).

Para a realização do exame parasitológico devem ser colhidas 3 amostras de fezes em dias diferentes, de preferência alternados, durante um período máximo de 10 dias (Fonseca, et al., 2004).

No LACSM é feito inicialmente um exame macroscópico onde é observado a cor, a consistência, a presença de muco, sangue e de outra informação orientadora. Posteriormente, é realizado um exame microscópico após concentração pelo método de sedimentação por centrifugação de Ritchie, com o intuito de concentrar no sedimento quistos de protozoários, e ovos e larvas de helmintas, e de eliminar a maior parte dos resíduos fecais. O sedimento é então observado ao microscópio óptico, entre uma lâmina e lamela, sendo corado com recurso a uma solução de lugol para facilitar a visualização destas estruturas.

c) PESQUISA DE SANGUE OCULTO

Algumas doenças gastrointestinais, como é o caso da úlcera péptica, inflamação intestinal, pólipos colo-retais e cancro colo-retal podem causar o aparecimento de sangue oculto nas fezes. A utilização de testes rápidos para a deteção de sangue oculto permite a deteção qualitativa de baixos níveis de sangue nas fezes, mesmo quando não haja manifestação de outros sintomas numa fase ainda precoce da doença (Lin & Chang, 2021). Vários estudos

têm demonstrado que estes testes podem reduzir a incidência da mortalidade de doenças, tais como o cancro coloretal (Meklin, Syrjänen & Eskelinen, 2020).

No LACSM a pesquisa de sangue oculto nas fezes é realizada recorrendo a um teste rápido imunocromatográfico, o *Fecal Occult Blood (FOB) Rapid Test* (Healgen Scientific, LLC, Houston, Texas). Este teste é utilizado como complementar ao diagnóstico, sendo depois interpretado pelo médico com auxílio a outros métodos de diagnóstico.

d) PESQUISA DE ADENOVÍRUS E ROTAVÍRUS

Vírus entéricos como o adenovírus e o rotavírus são conhecidos agentes etiológicos de gastroenterites agudas e de diarreia, principalmente, na idade pediátrica (Demiray, 2016). Os rotavírus têm demonstrado ser os agentes infecciosos mais prevalentes, cujas manifestações clínicas podem ir desde leves a casos graves de desidratação. O período de incubação é de 1 a 3 dias, e as manifestações clínicas têm uma duração média de 5 a 7 dias. Já as infeções por adenovírus possuem um período de incubação longo, tipicamente de 8 a 10 dias, e as manifestações clínicas podem ter uma duração até 2 semanas, estando estas associadas a casos menos severos de desidratação (Hamer, Gill & Chilengi, 2017).

No LACSM a pesquisa destes vírus é feita recorrendo ao teste rápido qualitativo *Combi-Strip Rapid Diagnostic Test for in vitro Rotavirus and Adenovirus Detection in Stool Specimens* (Coris BioConcept, Gembloux, Bélgica).

e) PESQUISA DE *Clostridium difficile*

A bactéria *C.difficile* é um bacilo anaeróbio Gram-positivo formador de esporos, que é adquirido por via fecal-oral. Este bacilo pertence à microbiota intestinal de uma pequena percentagem da população adulta, onde tipicamente existe num estado não patogénico. Este bacilo é uma bactéria oportunista que tira partido de um desequilíbrio na microbiota intestinal, que pode ser causada por tratamento com antibióticos. Este desequilíbrio permite a sua proliferação, cuja patogenicidade está relacionada com a capacidade de a estirpe produzir toxinas, a toxina A (enterotoxina) e a toxina B (citotoxina). Ambas as toxinas podem-se ligar à superfície das células epiteliais intestinais onde são internalizadas, mediando reações que causam morte celular e inflamação, bem como manifestações clínicas, tais como, diarreia e/ou colite pseudomembranosa (Neemann & Freifeld, 2017).

A pesquisa de *C.difficile* apenas é efetuada quando solicitada, e em amostras de fezes diarreicas (Fonseca, et al., 2004). O diagnóstico é então feito por uma combinação de sinais e

sintomas associados à confirmação da presença de estirpes de *C.difficile* produtoras de toxinas e das toxinas produzidas por *C.difficile* em amostras fecais (Debast., Bauer & Kuijper, 2014).

No LACSM a pesquisa de *C.difficile* é feita recorrendo ao teste rápido imunoenzimático TECHLAB®C.DIFF QUIK CHEK COMPLETE® (TECHLAB, Inc., Blacksburg, Virgínia). Este teste deteta em simultâneo a presença do antígeno de *C.difficile*, o glutamato desidrogenase (GDH), e a presença das toxinas A e B, confirmando a presença de estirpes de *C.difficile* produtoras de toxinas. Quando é obtido um resultado positivo a amostra é então enviada para o laboratório SYNLAB em Lisboa para a realização da confirmação do resultado recorrendo a testes moleculares.

3. TECIDOS E EXSUDADOS PURULENTOS DE FERIDAS

As feridas variam nas suas características, severidade e riscos associados. A infeção de uma ferida pode acarretar consequências sérias, que podem ir desde um atraso no processo cicatrização, à formação de abscessos, e em casos mais graves à disseminação de microrganismos, como bactérias ou das toxinas produzidas pelas mesmas, a outras áreas do corpo (Nester, Anderson & Roberts, 2011). Consoante a localização e o tipo de ferida muitos são os microrganismos que poderão ser responsáveis pelo desenvolvimento de infeções conduzindo à formação de exsudados purulentos (Fonseca, et al, 2004).

No LACSM o pus é semeado nos meios: gelose de sangue (COS), gelose de chocolate (PVX), Chapman (MSA2), Saboraud (SGC2), MCK e no caldo de enriquecimento Brain Heart Infusion Broth (BHI). O COS e o PVX são incubados na estufa a 37°C durante 24 a 48 horas, numa atmosfera com CO₂. Os meios MSA2, MCK e o caldo BHI são incubados na estufa a 37°C durante 18 a 24 horas, e o SGC2 é incubado a 25°C durante 5 dias. O caldo BHI após o referido tempo de incubação é repicado para todos os meios referidos previamente, que são incubados nas condições previamente referidas.

A valorização das colónias é tida em conta consoante a localização e o tipo de ferida.

4. EXSUDADO URETRAL E VAGINAL

O trato genital é uma via de entrada para vários agentes infecciosos. As infeções do trato genital podem ser de três tipos: doenças sexualmente transmissíveis, cujo os possíveis agentes responsáveis podem ser *Clamidia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* entre outras; infeções endógenas, que são causadas pelo crescimento excessivo de microrganismos naturalmente presente no trato genital da mulher, tais como, as causadas por

Gardnerella vaginalis ou por *Candida albicans*; e infeções iatrogénicas, as quais estão associadas a complicações resultantes de procedimentos médicos. Muitas destas infeções são tratáveis e podem ser prevenidas (Patel, et al., 2003).

A pesquisa dos agentes infecciosos anteriormente referidos no caso da mulher é feito a partir de exsudados endocervicais, vaginais ou uretrais, e no caso do homem é feito a partir de exsudados uretrais. Para a obtenção do exsudado endocervical e o vaginal é introduzido um espéculo sem lubrificante ou humedecido com soro fisiológico estéril, sendo a colheita feita recorrendo a uma zaragatoa de alginato de cálcio. No exsudado uretral tanto na mulher como no homem a colheita deve ser feita, sempre que possível, antes da primeira micção, caso contrário deve ser feito uma hora após a última micção, recorrendo a uma zaragatoa fina e flexível. Em todas estas situações devem ser colhidas 2 zaragatoas, uma para ser utilizada para realizar o exame direto, e uma que é para ser utilizada para realizar o exame cultural, sendo esta introduzida em meio de transporte com carvão (Fonseca, et al., 2004).

No LACSM é feita normalmente a pesquisa de *T. vaginalis*, *G. vaginalis*, *N. gonorrhoeae* e *Candida spp.*. Já a pesquisa de *C. trachomatis* e de *Streptococcus agalactiae* apenas são feitas quando pedidas pelo médico.

O procedimento dos exsudados que chegam para pesquisa dos microrganismos previamente referidos consiste na realização de um exame direto a fresco realizado numa lâmina com soro fisiológico, e na realização de um exame direto após coloração de Gram (**Anexo I**), bem como na realização de exame cultural. Para o exame cultural as amostras são semeadas nos meios COS, PVX e SGC2. Os meios COS e PVX são incubados na estufa a 37°C durante 24 a 48 horas, numa atmosfera com CO₂. O meio SGC2 é incubado na estufa a 25°C durante 5 dias.

a) PESQUISA DE *Trichomonas vaginalis*

Tricomoniase é uma infeção sexualmente transmitida causada pelo protozoário flagelado *T. vaginalis*. Nas mulheres um dos sinais característicos desta infeção consiste num exsudado espumoso, de cor verde-amarelada e com um odor fétido. Os homens são tipicamente assintomáticos (Nester, Anderson & Roberts, 2011).

No LACSM o exame direto a fresco constitui o único método de diagnóstico da infeção provocada por *T. vaginalis*. Este protozoário é constituído por 4 flagelos livres e uma membrana ondulante, e possui um movimento característico que pode ser observado no exame microscópico.

a) PESQUISA DE *Neisseria gonorrhoeae*

A Gonorreia é uma doença sexualmente transmitida, cujo agente etiológico é *N. gonorrhoeae*, um diplococo Gram-negativo (**Figura 3**). Este diplococo pode ser inconscientemente transmitido durante meses a anos por homens e mulheres assintomáticos. Grande parte das mulheres são assintomáticas (Nester, Anderson & Roberts, 2011).

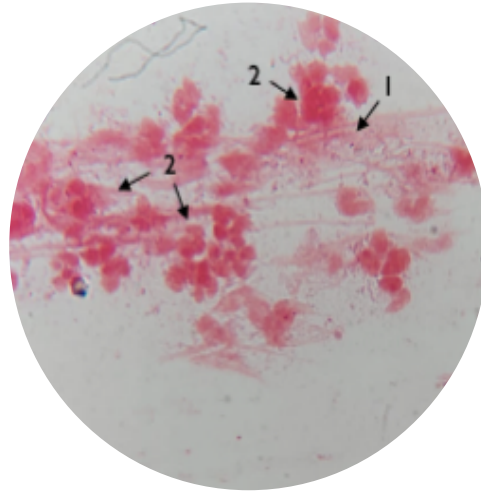


Figura 3 - Lâmina corada com a técnica de coloração de Gram proveniente de uma amostra de um exsudado uretral, onde é possível observar a presença de diplococos de Gram-negativos (1) sugestivos de *N.gonorrhoeae*. Também é possível observar a presença de um grande número de polimorfonucleares (2) (Fotografia registada no LACSM).

No LACSM numa amostra proveniente de um exsudado uretral de um homem caso se observe no exame direto após coloração de Gram a presença de diplococos de Gram negativos intracelulares sugestivos de *N. gonorrhoeae*, esta informação é sensível o suficiente para dar como diagnóstico final. Já no caso da mulher é necessário recorrer ao exame cultural, pois o exame direto da coloração de Gram possui uma fraca sensibilidade, tal podendo ser explicado pela presença de outras espécies bacterianas pertencentes à normal flora vaginal da mulher, que podem dificultar o correto diagnóstico (Unemo, *et al.*, 2019).

A *N. gonorrhoeae* é uma bactéria fastidiosa que requer um meio rico como o PVX, meio utilizado no LACSM, para o isolamento deste diplococo. Pelo que, ao fim de 48 horas se se observar o crescimento de colónias sugestivas de *N.gonorrhoeae*, que são colónias pequenas, brilhantes e sem provocar hemólise, deve-se efetuar os testes complementares de identificação, o teste da catalase e o da oxidase, que deverão ser positivos, bem como proceder à confirmação da identificação com recurso ao VITEK®2 COMPACT, utilizando a carta NH. Para a obtenção do antibiograma, o meio de cultura com colónia pura é enviado para o laboratório SYNLAB em Lisboa, bem como é feita a declaração obrigatória ao INSA.

b) PESQUISA DE *Gardnerella vaginalis*

A vaginose bacteriana é descrita como sendo resultante de um desequilíbrio na normal microflora vaginal, a qual é, por norma, predominantemente constituída por *Lactobacillus* spp.. Os microrganismos comumente associados à vaginose bacteriana são a *G. vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Peptostreptococcus* spp., *Prevotella* spp., *Mobiluncus* sp., *Bacterioides* spp., em que a *G.vaginalis* é o microrganismo mais frequentemente isolado. Clinicamente, a sintomatologia é caracterizada por um exsudado vaginal esbranquiçado, abundante, fino e homogéneo, com um pH vaginal superior a 4,5, com um mau odor (cheiro a peixe), que é exacerbado aquando da adição de hidróxido de potássio (KOH) a 10%. Para além destas características, também é possível visualizar a presença de *clue cells* no exame direto (Wong, et al., 2018).

A bactéria *G. vaginalis* é um bacilo ou cocobacilo pleomórfico de Gram variável. Esta bactéria é β -hemolítica em meio contendo sangue humano ou de coelho, mas não em meio contendo sangue de ovelha. Este microrganismo é anaeróbio facultativo, sendo a hemólise otimizada quando o meio é incubado em condições anaeróbias (Catlin, 1992).

No LACSM a *G.vaginalis* é detetada pelo exame direto, no qual é pesquisada a presença de *clue cells*, células epiteliais cobertas por cocobacilos frequentemente observadas em exsudados vaginais de mulheres com vaginose bacteriana, mas não observadas em mulheres clinicamente saudáveis (Gilbert, et al., 2019).

c) PESQUISA DE *Candida* spp.

O principal agente etiológico responsável pelas candidíases vulvovaginais é a *C. albicans*, uma levedura que faz parte da normal microbiota da vagina. A candidíase ocorre após um desequilíbrio na microbiota da vagina. Os sinais e sintomas mais comuns da candidíase são um constante e intenso prurido na vagina ou vulva, um exsudado abundante com um aspecto grumoso e com uma cor esbranquiçada a acinzentada (Nester, Anderson & Roberts, 2011).

No LACSM a pesquisa de *Candida* spp. é feita com um exame a fresco e com um exame direto em uma lâmina corada pela técnica de coloração de Gram. Também se realiza um exame cultural no meio SGC2 (*bioMérieux*, Marcy-l'Etoile, França), que é incubado na estufa a 25°C.

No exame direto a fresco e no exame direto corado com a técnica de Gram, perante uma candidíase é expectável a observação de uma predominância de leveduras. Na técnica de coloração de Gram as leveduras apresentam-se coradas de roxo. Já no exame cultural observa-se a placa ao fim de 48 horas e verifica-se se há crescimento de colónias no meio. Caso não haja crescimento de colónias, mas se verifique uma predominância de leveduras no exame direto, então a placa permanece na estufa até se obter um crescimento de colónias que permita a realização da respetiva identificação. Quando se verifica o crescimento de colónias (**Figura 4**) procede-se à identificação com recurso ao VITEK®2 COMPACT, utilizando a carta YST.



Figura 4 - Colónias de *C. albicans* no meio SGC2 provenientes de uma amostra de um exsudado vaginal (Fotografia registada no LACSM).

d) PESQUISA DE *Chlamydia trachomatis*

A *C. trachomatis* é uma bactéria Gram-negativa intracelular obrigatória responsável por uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns. Os principais sinais e sintomas nos homens são um exsudado acinzentado proveniente do pénis, e nas mulheres é um abundante exsudado vaginal, sangramento vaginal e dor abdominal. A maioria das mulheres e dos homens são assintomáticos (Nester, Anderson & Roberts, 2011).TM

A pesquisa de *C. trachomatis* no LACSM é feita recorrendo ao teste rápido ABON *Chlamydia Rapida Test Device (Swab/Urine)* (Abon Biopharm, Hangzhou., República Popular da China). Este teste consiste num teste imunocromatográfico para a deteção qualitativa de *trachomatis* em exsudados cervicais nas mulheres, e em exsudados uretrais e na urina dos homens (Mawak, et al., 2011).

e) PESQUISA DE *Streptococcus agalactiae*

A bactéria *Streptococcus* β -hemolítica do grupo B de Lancefield, também conhecida por *Streptococcus agalactiae*, é um coco de Gram-positivo reconhecido como o principal agente de sépsis neonatal, possuindo importantes taxas de morbidade e mortalidade, principalmente em recém-nascidos prematuros. A transmissão de *S. agalactiae* pode ocorrer por via vertical, durante a gravidez e sobretudo durante o parto, manifestando-se por doença neonatal precoce. A doença infantil provocada por *S. agalactiae* distingue-se em doença neonatal precoce, doença neonatal tardia e doença muito tardia. A doença neonatal precoce ocorre nos primeiros 7 dias de vida, e manifesta-se principalmente sob a forma de pneumonia e sépsis. A doença neonatal tardia ocorre após a primeira semana de vida e durante os primeiros 3 meses, e manifesta-se por febre, bacteriemia e meningite. A doença neonatal muito tardia ocorre após os 3 meses de vida, sendo esta a menos prevalente, e cujas manifestações são ITU e amigdalite aguda. A maioria das grávidas colonizadas por *S. agalactiae* apresentam-se como assintomáticas (Moreira, et al., 2013).

Segundo a Direção-Geral da Saúde (DGS) (2011), é aconselhado a todas as grávidas o rastreio de *S. agalactiae* entre as 35 e 37 semanas, permitindo identificar as que se encontram em risco de ter um recém-nascido com sépsis neonatal.

No LACSM a pesquisa de *S. agalactiae* é feita recorrendo ao exame cultural no meio granada (GRAN). As amostras provenientes de exsudados vaginais/ano-retais são semeadas no meio GRAN, e vão a incubar na estufa a 37°C durante 48 horas em anaerobiose.

O meio GRAN é um meio seletivo para a identificação de *S. agalactiae*. Este meio é constituído por uma mistura de antibióticos, de modo a inibir a maioria das bactérias Gram-negativas e leveduras, dado as amostras serem provenientes de zonas com flora polimicrobiana (Moreira, et al., 2013). Este meio também possui na sua constituição metotrexato, soro e amido, permitindo a produção de um pigmento cor-de-laranja característico das colónias de *S. agalactiae* (El Aila, et al., 2010). A pesquisa de *S. agalactiae* é então dada como positiva quando é observado o crescimento de colónias cor-de-laranja (**Figura 5**). Caso ao fim de 48 horas não forem observadas da cor previamente referida, então o resultado é dado como negativo.

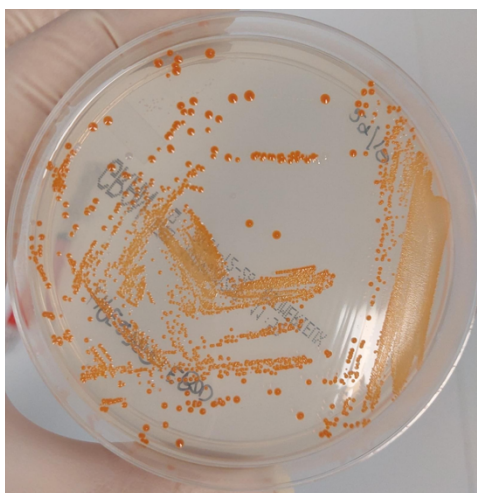


Figura 5 - Colônias de *S. agalactiae* no meio GRAN provenientes de uma amostra de um exsudado vaginal (Fotografia registada no LACSM).

5. EXSUDADO FARÍNGEO E NASAL

O sistema respiratório é constituído pelo trato respiratório superior e trato respiratório inferior. O trato respiratório superior inclui o nariz e cavidade nasal, a faringe, a epiglote e a laringe, apresentando uma microbiota diversificada. O trato respiratório inferior inclui a traqueia, os brônquios e os pulmões, os quais são normalmente estéreis, não possuindo uma microbiota associada. A microbiota do trato respiratório superior é normalmente constituída por bactérias dos géneros *Staphylococcus* spp., incluindo o potencial agente patogénico *Staphylococcus aureus*; *Corynebacterium* spp.; *Moraxella* spp., nos quais alguns se assemelham microscopicamente ao agente patogénico *Neisseria meningitidis*; *Haemophilus* spp., incluindo o potencial agente patogénico *Haemophilus influenza*; *Bacteroides* spp.; e *Streptococcus* spp., no qual inclui frequentemente o potencial agente patogénico *Streptococcus pneumoniae*. Apesar destes agentes colonizadores habitualmente serem inofensivos, quando o sistema imunitário do hospedeiro se encontra debilitado, estes são agentes oportunistas e podem causar doença (Nester, Anderson & Roberts, 2011). No entanto, é de referir que a maioria das infeções do trato respiratório superior são causadas por vírus (Jain, Lodha & Kabra, 2001).

Para a deteção de agentes patogénicos nas vias aéreas superiores é necessária a correta colheita e transporte dos exsudados faríngeos e nasais. Para a colheita do exsudado faríngeo recorre-se a uma zaragatoa, a qual é colocada por detrás da úvula efetuando a colheita na faringe posterior, amígdalas e nas áreas inflamadas e ulceradas, com o cuidado de não tocar na mucosa bucal e lingual. A zaragatoa deve ser enviada no meio de transporte apropriado ao microrganismo a pesquisar. Já para a colheita do exsudado nasal é inserida uma zaragatoa em

cada narina até encontrar resistência, momento no qual roda-se a zaragatoa contra a mucosa nasal. A zaragatoa é colocada no meio de transporte adequado e é enviada rapidamente para o laboratório (Fonseca, *et al.*, 2004)

a) ESTUDO DA COLONIZAÇÃO por *Staphylococcus aureus* meticilina resistente

A bactéria *S. aureus* é uma bactéria comensal, mas também representa um dos principais agentes etiológicos de endocardites, bacteriemia, osteomielite, infecções na pele e tecidos moles, infecções nos ossos e articulações e de infecções nosocomiais. Inicialmente, a terapêutica consistia no uso de penicilina. No entanto, esta bactéria rapidamente criou resistência à penicilina. Após a introdução de uma penicilina sintética, a meticilina, desenvolvida para ultrapassar a resistência a esse antibiótico, observou-se o aparecimento de *S. aureus* meticilina resistente (MRSA, do inglês *methicilin-resistant S.aureus*). A resistência à meticilina é mediada pelo gene *mecA*, o qual faz parte do elemento genético móvel designado de *Staphylococcal Cassete Chromosome mec* (SCCmec). O gene *mecA* codifica a *Penicillin-Binding Protein 2a* (PBP2a), a qual tem baixa afinidade para os β -lactâmicos, prevenindo-os de inibir a biossíntese da parede celular, resultando na resistência observada com esta classe de antibióticos (Turner, *et al.*, 2019). Mais recentemente foram identificadas estirpes MRSA na qual o gene *mecC* foi identificado como responsável por mediar a resistência a antibióticos da classe dos β -lactâmicos (Milheiriço, De Lencastre & Tomasz, 2017).

Inicialmente a bactéria MSRA era responsável apenas por infecções nosocomiais, mas posteriormente também se verificou que se encontrava associada a infecções adquiridas na comunidade. Apesar da recente redução da incidência das infecções provocadas pela MRSA, esta ainda apresenta um risco clínico elevado, com uma elevada morbidade e mortalidade associada (Turner, *et al.*, 2019).

No LACSM o estudo da colonização de MSRA é realizado essencialmente em exsudados nasais. A pesquisa pode ser realizada por exame cultural ou por testes moleculares recorrendo ao sistema GeneXpert® IV (Cepheid, Sunnyvale, Califórnia). O método a utilizar deve constar na requisição médica.

O exame cultural é realizado recorrendo ao meio cromogéneo *Chromid*® MRSA Smart (MRSM) (*bioMérieux*, Marcy-l'Etoile, França). Este é um meio seletivo e diferencial para MRSA. incubado a 37°C durante 18 a 24 horas em aerobiose.

No sistema *GeneXpert*[®] IV a detecção de MRSA é obtida por reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) em tempo real. O sistema *GeneXpert*[®] IV é utilizado em conjunto com o kit *Xpert*[®] MSRA NxG (*Cepheid*, Sunnyvale, Califórnia).

b) PESQUISA DE *Streptococcus* β -hemolítico do grupo A

A bactéria *Streptococcus* β -hemolítico do grupo A, também conhecida por *Streptococcus pyogenes*, é um coco Gram-positivo cuja infecção pela mesma resulta numa grande variedade de doenças. Esta bactéria é responsável por infecções na garganta, sendo o principal agente etiológico da faringite bacteriana, e por infecções na pele, tais como, impetigo, erisipela, celulite, escarlatina, entre outras. Quando as infecções provocadas por *S.pyogenes* não são corretamente tratadas, podem resultar em complicações como glomerulonefrite aguda e febre reumática (Ferretti, Stevens, & Fischetti, 2016).

No LACSM, para o auxílio no diagnóstico de faringites bacterianas causadas por *S. pyogenes*, a pesquisa é feita recorrendo ao teste rápido imunocromatográfico *Clearview*[®] *Exact Strep A* (*Abon Biopharm*, Hangzhou, República Popular da China).

A confirmação de um resultado negativo no LACSM é feito através de exame cultural e teste complementar de identificação. O exame cultural consiste em semear a amostra no meio COS, o qual é incubado na estufa a 37°C durante 18 a 24 horas, numa atmosfera com CO₂. O teste complementar de identificação consiste no teste da catalase. Caso não se observe a β -hemólise, uma região clara à volta das colónias, e caso o teste da catalase dê negativo, então confirma-se o resultado negativo.

6. EXPECTORAÇÕES

O trato respiratório inferior é um ambiente estéril e não possui normalmente uma microbiota associada. Infecções no trato respiratório inferior ocorrem quando os agentes infecciosos ultrapassam as barreiras do trato respiratório superior. Estas infecções podem resultar da inalação de aerossóis infecciosos, da aspiração de conteúdo oral ou gástrico, ou da disseminação hematogénea (Mahon & Lehman, 2019).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2019), as infecções do trato respiratório inferior são a quarta causa de morte em todo o mundo. Os síndromes clínicos associados consistem na bronquite, bronquiolite, pneumonia (adquirida na comunidade, nosocomial, por aspiração e crónica) e no empiema (Mahon & Lehman, 2019).

A obtenção de uma amostra de boa qualidade é fundamental para um célere e correto diagnóstico do agente etiológico responsável pelo síndrome clínico. No entanto, este

diagnóstico é frequentemente dificultado devido à contaminação pela normal flora da orofaringe durante a colheita (Fonseca, *et al.*, 2004).

No LACSM é frequente a receção de expetorações para o estudo microbiológico do agente responsável pela infeção no trato respiratório inferior de um paciente. Para a correta obtenção da amostra a ser processada, o paciente é instruído a colher por tosse profunda preferencialmente a primeira amostra da manhã. Esta deve ser colhida em jejum, e a boca deve ser previamente lavada apenas com água. A amostra deve ser colhida para um recipiente estéril, de boca larga e tampa de rosca (Fonseca, *et al.*, 2004).

Nas expetorações recebidas é efetuado um exame cultural e também um exame direto após colorações de Gram e Kinyoun (**Anexo II**). No exame cultural estas amostras são semeadas nos meios COS, PVX, MCK, MSA2 e SGC2. Os meios COS e PVX são incubados na estufa a 37°C durante 24 a 48 horas, numa atmosfera com CO₂. Os meios MCK e MSA2 são incubados na estufa a 37°C durante 18 a 24 horas em aerobiose. O meio SGC2 é incubado na estufa a 25°C durante 5 dias. Para a realização do exame direto e do cultural é tido o cuidado de selecionar a porção purulenta da amostra.

Ao realizar o exame direto após coloração de Gram é avaliada a qualidade da amostra. Para determinar a qualidade da amostra é então observado ao microscópio ótico cerca de 10 campos com a objetiva de 10x. Nesta avaliação é tido em consideração os critérios de Murray e Washington (**Tabela I**). As amostras com a qualidade exigida pertencem ao grupo 4 e ao 5. As amostras que se inserem nos restantes grupos não são consideradas como verdadeiras expetorações, e não são válidas para prosseguir com o estudo microbiológico (Fonseca, *et al.*, 2004).

Tabela I - 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

Recorrendo ao microscópio ótico, e com a objetiva de 100x em óleo de imersão, é posteriormente verificado se há algum microrganismo predominante. Caso tal se verifique, este microrganismo é considerado como o agente etiológico. O microrganismo observado

pelo exame direto e o determinado pelo exame cultural devem ser concordantes. Na presença de diversos microrganismos estamos então perante uma amostra polimicrobiana e o exame cultural não será valorizado.

O meio COS é um meio de isolamento altamente nutritivo destinado a facilitar a recuperação e isolamento de microrganismos fastidiosos. A presença de sangue devido aos seus constituintes, a hemina (factor X) e vitamina K, fornece fatores de crescimento requeridos para certos microrganismos anaeróbios obrigatórios (Zimbro, et al., 2009). O sangue adicionado também torna possível a revelação de hemólise. O tipo de hemólise permite orientar na identificação bacteriana (Facklam, et al., 1979). Na α -hemólise observa-se um halo com coloração esverdeada à volta da colónia, o que pode orientar para a suspeita de uma estirpe de *S. pneumoniae*. Na β -hemólise é observada uma zona clara à volta ou por baixo da colónia (**Figura 6**), podendo orientar para a suspeita da presença de estirpes de *S.pyogenes* ou *S.aureus* (Zimbro, et al., 2009). É de ressaltar que, posteriormente, é sempre necessário a realização de testes complementares de identificação dos microrganismos isolados.

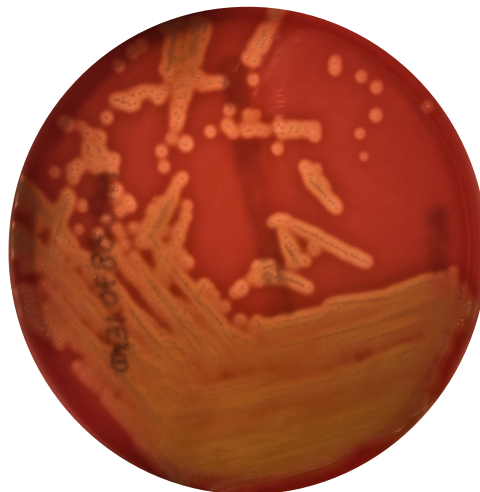


Figura 6 - Colónias β -hemolíticas no meio COS (Fotografia registada no LACSM).

O meio PVX é um meio de isolamento que permite o crescimento e isolamento de microrganismos fastidiosos, em particular, de estirpes pertencentes aos géneros *Neisseria* e *Haemophilus*. Ressalva-se a necessidade de posteriormente realizar testes complementares de identificação.

O meio MCK é um meio de isolamento seletivo de enterobactérias e outras bactérias de Gram-negativo.

O meio MSA2 é um meio utilizado para o isolamento seletivo de estafilococos. A presença de colónias amarelas permite a identificação presuntiva de *S.aureus*, que deverá ser seguida da realização de testes complementares adequados (Zimbro, et al., 2009).

O meio SGC2 é um meio seletivo para o isolamento de fungos.

Após o período de incubação, a colónia de interesse é repicada para um novo meio, para a obtenção de uma cultura pura, e posterior identificação e obtenção do respetivo antibiograma, recorrendo ao VITEK®2 COMPACT.

No LACSM é realizado o exame direto após coloração de Kinyoun (**Anexo II**), com o intuito de se detetar a presença de Bacilos Ácido-Álcool Resistentes (BAAR). O exame cultural não é realizado no LACSM, pelo que amostras suspeitas ou com pedidos orientados são enviadas para o laboratório SYNLAB em Lisboa, após a respetiva observação ao microscópio. Na deteção de apenas um BAAR o resultado é considerado positivo.

C. HEMOCULTURAS

O sangue é um produto biológico estéril, pelo que a presença de um microrganismo na corrente sanguínea é causa de morbidade e mortalidade, a nível global. A hemocultura é então um importante procedimento, que permite a deteção de bactérias ou fungos no sangue (Fonseca, *et al.*, 2009; Riedel & Carroll, 2010).

A correta obtenção de amostra é fundamental para a deteção e identificação do microrganismo presente no sangue. O volume de sangue colhido, principalmente, em adultos, é um dos fatores críticos para a deteção do microrganismo. Nos adultos a concentração de microrganismos é baixa na maioria das bacteriémias, devendo ser colhidos entre 10 a 30 mL de sangue, por punção venosa. Nas crianças a concentração de microrganismos durante o período de bacteriemia é muito maior, por isso são necessários menores volumes de sangue, sendo colhidos entre 1 a 5 mL de sangue, por punção venosa. O momento da execução da colheita para hemocultura é um fator a ter em consideração, pelo que não se deve colher sangue no pico febril. O número de frascos e o intervalo das colheitas é um factor que depende da situação clínica e da urgência que exista para iniciar a antibioterapia. No momento da colheita também há que ter o cuidado de ao obter mais do que uma hemocultura sequencialmente, devem ser efetuadas punções em diferentes veias periféricas. Destaca-se ainda a importância de no momento da colheita ter sido tido o cuidado de desinfetar corretamente o local da punção, para evitar a contaminação (Fonseca, *et al.*, 2009).

No LACSM costumam chegar dois frascos de hemocultura por cada amostra. Um dos frascos de cultura é para detetar aeróbios e outro para detetar anaeróbios. Estes são imediatamente colocados no equipamento *BACT/ALERT®3D* (*bioMérieux*, Marcy l'Étoile, France). Os frascos de hemocultura ficam a incubar durante cinco dias a uma temperatura de 37°C.

O equipamento *BACT/ALERT*[®]3D, consiste num sistema de deteção microbiana automatizado baseado na deteção colorimétrica de CO₂ produzido pelos microrganismos em crescimento. Na base de cada frasco existe um sensor permeável ao CO₂, o qual adquire uma coloração amarela, devido à acidificação do meio por consequência do CO₂ produzido pelo microrganismo. A deteção da alteração da cor é feita pelo equipamento a cada 10 minutos (Bugno, et al., 2015).

Quando o equipamento dá a indicação de uma hemocultura positiva efetua-se o exame direto após coloração de Gram, e realiza-se a subcultura em determinados meios de acordo com o frasco em que positivou. Caso tenha positivado na hemocultura para deteção de aeróbios, então é feita a subcultura nos meios COS, PVX e SGC2. Os meios COS e PVX são incubados na estufa a 37°C durante 24 a 48 horas, numa atmosfera com CO₂. O meio SGC2 é incubado na estufa a 25°C durante 5 dias. Caso tenha positivado na hemocultura para deteção de anaeróbios, é feita a subcultura em COS e PVX, nas mesmas condições referidas anteriormente. E, adicionalmente, também é realizada uma subcultura em meio PVX, o qual vai a incubar em anaerobiose, sendo igualmente incubado na estufa a 37°C durante 24 a 48 horas. Qualquer microrganismo que seja valorizado no exame direto e exame cultural é identificado e obtido o antibiograma com recurso ao *VITEK*[®]2 COMPACT.

É de realçar que quando uma hemocultura positiva, tal informação é imediatamente transmitida ao médico, acompanhada da indicação da morfologia do microrganismo e do Gram do mesmo. Tal permite que o doente comece uma terapia empírica até a obtenção do diagnóstico final, possibilitando um melhor prognóstico.

X. BIOQUÍMICA

A valência da bioquímica no laboratório de análises clínicas tem como principal objetivo analisar substâncias em fluídos ou tecidos corporais, tanto a nível qualitativo como quantitativo, com o intuito final de auxiliar no diagnóstico de uma patologia e na monitorização do tratamento (Kumar & Gill, 2018).

No período de tempo que passei nesta valência, apesar de curto, permitiu-me acompanhar a generalidade da rotina laboratorial, que passa desde a manutenção diária e constante dos diversos equipamentos e seus reagentes, o processamento dos controlos internos e, posterior, processamento das amostras. É de salientar a importância de garantir de que os valores de controlo interno, se encontrem de acordo com as especificações já estabelecidas para os diversos parâmetros, caso contrário é necessário proceder à respetiva calibração. Caso esta ação não tenha surtido efeito é necessária avaliar outras possíveis causas

por de trás do erro, e tomar as medidas necessárias para garantir que o método volte a estar sob controle, e garanta a qualidade dos resultados.

Nesta valência as amostras tipicamente processadas são o soro e a urina, mas podem ser analisados outros fluidos corporais. Neste sentido, tive a oportunidade de processar um líquido cefalorraquidiano (LCR), no qual os parâmetros solicitados para dosear foram a glucose e proteínas.

O soro é a amostra onde são determinados a maioria dos parâmetros bioquímicos, pelo que após a chegada da amostra é importante avaliar a qualidade desta, pois fatores como hemólise, lipémia e icterícia podem interferir nos valores doseados. Caso estes sejam observados é necessário requerer nova colheita de amostra.

Nesta valência, na urina são regularmente avaliadas as urinas tipo II e urinas de 24 horas, o que permite a monitorização da função renal. São também realizados testes de gravidez, testes qualitativos de deteção de drogas de abuso, nomeadamente, anfetaminas, barbitúricos, benzodiazepinas, canabinóides, cocaína e opiáceos, recorrendo a testes imunocromatográficos em cassete.

No LACSM, a bioquímica é uma valência que na sua maioria está automatizada, sendo que no **Anexo V** encontram-se os equipamentos utilizados, a metodologia, e os parâmetros analisados.

XI. IMUNOLOGIA

A imunologia clínica é uma importante valência que fornece dados fundamentais para auxiliar no diagnóstico e esclarecer os clínicos relativamente aos processos imunológicos por de trás da manifestação de certas patologias, tais como imunodeficiências, doenças autoimunes, doenças linfoproliferativa, alergias e doenças infecciosas. É de referenciar que a imunologia clínica é uma valência com um envolvimento fundamental na transplantação de tecidos (Miller, *et al.*, 2002).

Esta valência do laboratório usa diversas técnicas já estabelecidas e tem vindo a adotar várias técnicas emergentes. Devido à inter-relação com outras valências do laboratório, como a bioquímica, hematologia e microbiologia, existem algumas técnicas e testes semelhantes e que se relacionam. O uso destas técnicas, em simultâneo com o conhecimento dos conceitos de imunologia são fundamentais para o diagnóstico e monitorização de doenças imunomediadas (Tebo, *et al.*, 2014).

No LACSM o período que passei nesta valência foi em simultâneo com a de bioquímica. A rotina laboratorial nestas duas valências é muito semelhante, passando igualmente pela

manutenção diária e constante dos diversos equipamentos e seus reagentes, o processamento dos controles internos e, posterior, processamento das amostras.

Nesta valência são analisados vários parâmetros do foro imunoquímico, hormonal, marcadores tumorais e marcadores de doenças infecciosas, recorrendo aos equipamentos que se encontram no **Anexo VI**. Para além, dos parâmetros analisados de forma automatizadas, também são realizadas técnicas manuais (**Anexo VII**) para a deteção de doenças infecciosas. Tal como na bioquímica, o soro é a amostra onde são determinados a maioria dos parâmetros, com exceção nos testes rápidos de deteção de Malária e do Dengue.

XII. HEMATOLOGIA

O sangue é um elemento fundamental para a manutenção da vida. Este é responsável por transportar oxigénio dos pulmões para os tecidos; transportar dióxido de carbono para os pulmões, para depois estes o removerem do organismo; transportar glucose, proteínas e gorduras; e por transportar resíduos do metabolismo para o fígado e rins, para a posterior eliminação (Keohane, Smith & Walenga, 2016).

A fração líquida do sangue designa-se por plasma. O plasma é responsável por transportar e nutrir as células do sangue. Além disso, este fornece enzimas para a coagulação, que por sua vez protegem os vasos sanguíneos de traumas, e mantém a circulação. Existem 3 grandes grupos de células do sangue: os glóbulos vermelhos ou eritrócitos, os glóbulos brancos ou leucócitos, e as plaquetas ou trombócitos. A hematologia consiste no estudo destas células sanguíneas. A coloração e observação de esfregaços sanguíneos, a contagem, e avaliação da morfologia, fenótipo e genótipo, de todos estes tipos de células, permite prever, detetar e diagnosticar doenças que afetam as células sanguíneas. Deste modo, a hematologia é uma valência fundamental no laboratório, a qual permite aos médicos selecionar as terapêuticas mais adequadas, bem como monitorizar as consequências destas na evolução das respetivas patologias (Keohane, Smith & Walenga, 2016).

No decorrer do período em que estive nesta valência tive a oportunidade de acompanhar a generalidade da rotina laboratorial, incluindo a manutenção diária dos diversos equipamentos e seus reagentes, e processamento dos controles internos. Nesta valência participei ativamente no processamento das amostras e na realização e observação esfregaços de sangue periférico ao microscópio óptico. Também estive envolvida na validação analítica, onde pude fomentar os meus conhecimentos nesta área.

A. Hematopoiese

A hematopoiese consiste num processo contínuo e bem regulado de produção de células sanguíneas, o qual inclui a renovação, proliferação, diferenciação e a maturação destas. Deste processo resulta a formação, desenvolvimento e proliferação de todas as células sanguíneas funcionais que são libertadas da medula óssea para a circulação sanguínea (Keohane, Smith & Walenga, 2016).

Vários órgãos têm um papel na hematopoiese. Estes órgãos mudam conforme o desenvolvimento do ser humano desde feto a adulto. Inicialmente, no feto o principal local onde ocorre a hematopoiese é o saco vitelino. Com o desenvolvimento, esta passa a ocorrer no fígado e no baço. A medula óssea assume o papel principal na hematopoiese a partir dos 7 meses da vida fetal, e continua a assumir este papel na infância e na vida adulta. Na infância a hematopoiese ocorre em toda a medula óssea, mas durante este período há uma progressiva substituição da medula dos ossos longos por gordura, pelo que na vida adulta a hematopoiese fica confinada às vertebrae, costelas, esterno, sacro, pélvis, crânio, e às extremidades proximais do fémur e úmero (Ciesla, 2018; Hoffbrand & Moss, 2016).

A hematopoiese é regulada por um microambiente constituído por diversas células, estruturas e uma arquitetura que em conjunto garantem a produção das células sanguíneas na medula óssea. A arquitetura da medula óssea consiste num tecido ósseo envolvente, e nos vasos sanguíneos que o irrigam. A medula óssea é irrigada então por pequenas arteríolas que penetram o tecido ósseo, dando origem a uma densa rede de sinusoides, que drenam numa veia central. As células endoteliais que formam os vasos na medula óssea são importantes componentes do microambiente devido à produção de citoquinas que regulam as células estaminais hematopoiéticas e outros progenitores (Johnson, Zhang & Lucas, 2020).

As células estaminais hematopoiéticas por definição são células pluripotentes com a capacidade de se autorrenovar ou de se diferenciar em células progenitoras. Estas células progenitoras são células precursoras da linhagem mieloide e da linhagem linfoide (**Figura 7**). A partir das células progenitoras mieloides formam-se os eritrócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e plaquetas. Já as células progenitoras linfoides originam os linfócitos T, linfócitos B e as células *Natural Killer* (Keohane, Smith & Walenga, 2016).

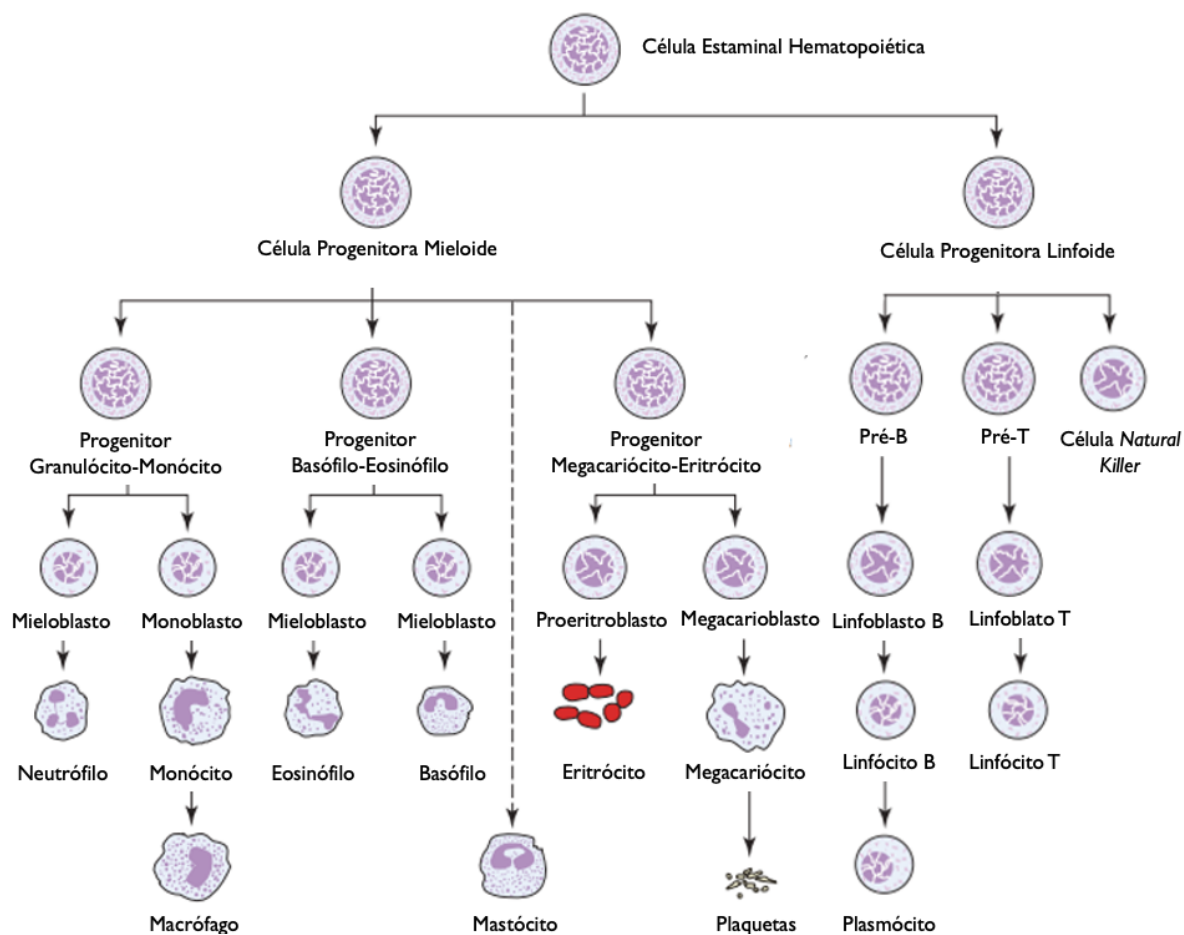


Figura 7 - Diagrama da Hematopoiese demonstrando a diferenciação e divisão da célula Estaminal Hematopoiética nas diferentes linhas celulares que originam os elementos figurados do sangue. Adaptado de: Keohane, Smith & Walenga, 2016.

B. Hemograma com contagem de plaquetas

O hemograma com contagem de plaquetas é dos testes laboratoriais mais solicitados. Este permite avaliar as células do sangue periférico, fornecendo informação fundamental que possibilita o diagnóstico de doenças hematológicas, assim como, detetar a presença de infeções, e monitorizar terapêuticas. Os valores de referência para os parâmetros avaliados no hemograma variam de acordo com a idade, sexo e etnia do utente (Dixon, 1997).

No LACSM o hemograma com respetivo eritrograma, leucograma e plaquetograma é obtido pelo analisador automatizado *Sysmex XN-550* (*Sysmex Corporation*, Kobe, Japão). Este analisador recorre à citometria de fluxo fluorescente para a contagem e análise dos leucócitos e dos reticulócitos. O princípio desta metodologia baseia-se na emissão de luz dispersa lateralmente, luz dispersa frontalmente, e na emissão de luz fluorescente lateral, quando células devidamente coradas são atingidas por um raio laser. A informação dada por estes três sinais permite a caracterização das células previamente referidas. A contagem dos eritrócitos e das plaquetas é determinada recorrendo a um outro método, o de impedância elétrica. E ainda há a utilização de um terceiro método, conhecido por SLS-Hemoglobina, que se baseia

na utilização do surfactante SLS (Lauril sulfato de sódio, do inglês *Sodium lauryl sulfate*), que permite a determinação da concentração de hemoglobina (Uchihashi, *et al.*, 2015).

A amostra utilizada para a obtenção do hemograma é o sangue total, e esta é transportada num tubo com ácido etilenodiamino tetra-acético dipotássico (EDTA K₂). O EDTA é o anticoagulante de escolha para os tubos com o sangue para a obtenção do hemograma, dado ser um agente quelante de cátions divalentes, como o cálcio. O cálcio é um elemento necessário para uma grande variedade de reações enzimáticas da cascata de coagulação, e a sua remoção previne a coagulação do sangue no tubo. O EDTA também possui a fundamental capacidade que preservar os componentes celulares e a morfologia das células do sangue (Banfi, Salvagno & Lippi, 2007).

I. Eritrograma

Os eritrócitos (ou glóbulos vermelhos) são pequenas células em forma de disco bicôncavo, que não possuem núcleo e têm uma duração média de vida de cerca de 120 dias. Os eritrócitos têm a importante e constante função de fornecer oxigénio aos tecidos, e de remover o dióxido de carbono gerado metabolicamente nestes, razão pela qual os eritrócitos terem de ser pequenos, viscoelásticos e resilientes, a fim de poderem passar pelo pequeno calibre dos capilares. Estes também possuem a importante característica de possuírem uma área de superfície relativamente grande, de forma a facilitar as trocas gasosas (Dixon, 1997).

O eritrograma é a secção do hemograma que integra os parâmetros que permitem quantificar e caracterizar os eritrócitos. Estes parâmetros são a contagem de eritrócitos (RBC, do inglês *Red Blood Cells*), a concentração de hemoglobina (Hb), o hematócrito (HCT) e os índices eritrocitários, isto é, o volume globular médio (VGM), a hemoglobina globular média (HGM), a concentração de hemoglobina globular média (CHGM), e o parâmetro que dá indicação da distribuição do diâmetro dos eritrócitos (RDW, do inglês *Red Cell Distribution Width*). Ocasionalmente, também é solicitada a contagem dos reticulócitos.

A contagem dos eritrócitos é determinada no equipamento pelo método de impedância elétrica. O princípio deste método consiste na deteção e medição de mudanças que ocorrem na resistência elétrica conforme as células atravessam um orifício entre dois eletrodos. A resistência elétrica entre dois eletrodos, ou impedância na corrente, ocorre quando a célula, má condutora de energia elétrica, passa pelo orifício, o que leva à formação de pulsos elétricos. O número de pulsos é proporcional ao número de células contadas, e a altura do pulso é proporcional ao volume da célula, o que permite discriminar e contar células específicas que passem pelo orifício. A passagem individual de células é garantida pela focagem

hidrodinâmica do fluxo de amostra. A amostra é injetada no seio de uma solução salina, sendo que a diferença de velocidade entre os dois fluidos faz com que o fluxo se processe em regime laminar, isto é, que haja a passagem célula a célula (Keohane, Smith & Walenga, 2016; Silva, *et al.*, 2004).

A hemoglobina representa 95% do conteúdo citoplasmático dos eritrócitos. Esta é eficientemente transportada pelo organismo nos eritrócitos, o que permite conferir proteção à hemoglobina contra a sua desnaturação no plasma e eliminação pelos rins. A hemoglobina é então o componente do eritrócito responsável pela função de transportar o oxigénio aos tecidos e transportar o dióxido de carbono dos tecidos para os pulmões. A hemoglobina também contribui para o equilíbrio ácido-base ao ligar e libertar iões de hidrogénio, e ainda transporta o óxido nítrico, que é um regulador do tónus vascular (Keohane, Smith & Walenga, 2016).

A hemoglobina é uma proteína globular constituída dois pares de cadeias polipeptídicas diferentes, e quatro grupos heme. Cada grupo heme encontra-se posicionado numa cavidade perto da superfície da molécula de hemoglobina. O grupo heme consiste num anel constituído por átomos de carbono, hidrogénio, azoto, e por um ião de ferro no centro. Para que ocorra a ligação reversível de oxigénio à hemoglobina é necessário que o ião ferro esteja no estado ferroso (Fe^{2+}) (Keohane, Smith & Walenga, 2016).

A determinação da concentração da hemoglobina é feita pelo método SLS-Hemoglobina. Este consiste na adição do surfactante SLS, o qual provoca a lise dos eritrócitos, e conseqüente libertação da hemoglobina. Por sua vez, o SLS com a sua atividade oxidativa converte o ferro da hemoglobina, que se encontra no estado ferroso para o estado férrico, formando-se assim a meta-hemoglobina. Esta reação induz a formação de um complexo entre o surfactante e a meta-hemoglobina, o qual produz uma curva de absorção característica obtida recorrendo à espectrofotometria (Oshiro, Takenaka, & Maeda, 1982; Billett, 1990).

Outro importante parâmetro que também integra o eritrograma é o hematócrito. Este corresponde à percentagem de volume total de eritrócitos relativo ao volume de sangue total. O valor do hematócrito no equipamento automatizado resulta das alturas dos pulsos cumulativos de todos os eritrócitos detetadas por impedância elétrica (Gay-George & Parker, 2003; Keohane, Smith & Walenga, 2016).

A contagem de eritrócitos, a concentração de hemoglobina e o hematócrito são parâmetros que estão intimamente relacionados, pelo que alterações em um dos parâmetros são habitualmente acompanhadas por alterações nos outros. Razão pela qual, valores superiores ou inferiores aos valores de referência de cada um destes parâmetros, devem ser avaliados em conjunto (Gay-George & Parker, 2003).

Valores de eritrócitos superiores aos de referência podem ser descritos como eritrocitose ou como policitemia. A eritrocitose é um termo mais preciso na descrição de um valor de eritrócitos elevados. Já a policitemia refere-se mais especificamente a um grupo de patologias que podem ser primárias ou secundárias. A causa primária, a policitemia vera, consiste numa doença mieloproliferativa relativamente rara da médula óssea que envolve a produção excessiva dos precursores dos eritrócitos. Já a causa secundária consiste num mecanismo fisiológico compensatório observado em situações de diminuição dos níveis de oxigénio, por consequência de malformações cardiovasculares, insuficiência cardíaca congestiva, entre outras. A desidratação também é uma causa para um relativo aumento dos valores de eritrócitos, Hb e HCT, em resultado de uma diminuição no volume do plasma. Outras causas para valores superiores são o exercício excessivo, ansiedade, dor, e certos fármacos, como a gentamicina, bem como tumores renais ou hepáticos (Gay-George & Parker, 2003).

Valores de eritrócitos, Hb e HCT inferiores aos de referência estão associados a hemodiluição ou anemia. Hemodiluição ocorre em resultado do aumento volume de plasma, em consequência de terapia com fluídos. A anemia é definida como uma diminuição no conteúdo de hemoglobina no sangue, o qual pode ser causado por uma diminuição nos valores dos eritrócitos, hemoglobina e HCT para valores inferiores aos dos intervalos de referência (Gay-George & Parker, 2003; Keohane, Smith & Walenga, 2016).

Os índices eritrocitários são valores calculados, usados para definir o tamanho dos eritrócitos, quantidade e concentração de hemoglobina no eritrócito. Estes valores são fundamentalmente usados para classificar os diferentes tipos de anemias. No **Anexo VIII** encontram-se os parâmetros referentes aos índices eritrocitários, isto é o VGM, a HGM, a CHGM, e o RDW, e os respetivos cálculos, e descrição dos respetivos significados clínicos.

A contagem de reticulócitos é um parâmetro que é ocasionalmente solicitado. Os reticulócitos são os precursores dos eritrócitos. Estes representam os eritrócitos imaturos na corrente sanguínea. O reticulócito ainda contém ácido ribonucleico (RNA) no citoplasma. Normalmente, o reticulócito permanece 2 dias na médula óssea e 1 dia na corrente sanguínea, antes de se desenvolver num eritrócito maduro. A contagem de reticulócitos é usada para avaliar a atividade eritropoética da medula óssea. A contagem de reticulócitos é particularmente útil na diferenciação entre anemias causadas por falha na médula óssea, de anemias causadas por perda ou destruição excessiva (Dixon, 1997; Keohane, Smith & Walenga, 2016).

A contagem de reticulócitos no analisador Sysmex XN-550 é determinada por citometria de fluxo, recorrendo ao uso de um corante fluorescente, a polimetina. Este

consegue-se ligar ao RNA citoplasmático permitindo a contagem dos reticulócitos através da medição da intensidade do sinal. A intensidade do sinal é diretamente proporcional à quantidade de ácido nucleico presente. Usando a emissão de luz dispersa frontalmente e o sinal de fluorescência, os reticulócitos conseguem ser distinguidos dos eritrócitos maduros. Além do mais, de acordo com a intensidade de fluorescência, os reticulócitos podem ser fracionados em 3 populações distintas, representando os diferentes estados de maturidade: reticulócitos de baixa fluorescência (LFR), reticulócitos de média fluorescência (MFR) e reticulócitos de alta fluorescência (HFR). Estas categorias de diferentes populações, permitem ainda a obtenção de mais um indicador, o da fração de reticulócitos imaturos (IRF), calculado pela soma dos MFR e dos HFR, e sendo referido como um indicador da eritropoiese (Buttarelo, *et al.*, 2004; Huh, Moon, & Chung, 2007).

2. Leucograma

Os leucócitos são derivados, tanto de células progenitoras mieloides como das linfoides. Os basófilos, eosinófilos, neutrófilos e monócitos provêm da linhagem mieloide. Os três primeiros também são referidos como granulócitos, devido à presença de grânulos citoplasmáticos distintos. Os linfócitos T, linfócitos B e células *Natural Killer* provêm da linhagem linfoide. Os leucócitos possuem maiores dimensões que os eritrócitos, e sua função consiste em defender o organismo contra substâncias estranhas e microrganismos. Cada tipo de leucócito possui um papel único na defesa do organismo, o que se encontra refletido pelas distintas estruturas celulares e no seu diverso arsenal de substâncias químicas (Dixon, 1997).

No **Anexo IX** encontram-se descritas as principais características e funções gerais das diferentes populações de leucócitos.

No *Sysmex XN-550* o método por de trás da obtenção do leucograma, consiste numa reação citoquímica das células seguida de análise por citometria de fluxo. Numa primeira instância é adicionado o agente de lise, o reagente *Lysercell™WDF* (Sysmex Corporation, Kobe, Japão), que perfura a membrana celular, permitindo a entrada do corante fluorescente, a polimetina. Este corante liga-se aos ácidos nucleicos e às proteínas bioreativas nos organelos citoplasmáticos. O efeito da composição destes dois reagentes sobre as células é ligeiro, permitindo que quase todas as estruturas das células se mantenham intactas. Posteriormente, a amostra é analisada pela citometria de fluxo, na qual as células ao passarem diante de uma fonte de luz laser ocorre a dispersão de luz em diferentes ângulos, que fornece diferentes informações. A luz dispersa frontalmente dá informação relativa ao tamanho da célula. A luz dispersa lateralmente dá informação relativa à estrutura interna da célula, isto é, dá informação relativa à sua granularidade citoplasmática. E ainda, a intensidade de fluorescência emitida graças ao fluoróforo utilizado, fornece indicação relativa ao teor em ácidos nucleicos. Este analisador

automatizado ainda fornece a possibilidade de identificar e quantificar a presença de granulócitos imaturos (promielócitos, mielócitos e metamielócitos) no sangue periférico (Briggs, et al., 2007; Maenhout & Marcellis, 2014).

3. Plaquetograma

As plaquetas são fragmentos do citoplasma dos megacariócitos. As plaquetas são células anucleadas, que contêm grânulos, e são as células com menores dimensões que se encontram no sangue periférico. Estas células têm um papel fundamental na hemóstase (George-Gay & Parker, 2003; Keohane, Smith & Walenga, 2016).

No plaquetograma, tipicamente, é obtida a contagem de plaquetas (expressa em número de células por litro de sangue), mas também pode ser obtido o volume plaquetário médio (VPM), a dispersão do volume plaquetar (PDW, do inglês *Platelet Distribution Width*) e o plaquetócrito (PCT). O PCT (expresso em %) representa o volume ocupado pelas plaquetas no volume de sangue total, e é análogo ao HCT. O PDW (expresso em fL) traduz o índice de variação no tamanho das plaquetas, ou seja, traduz a heterogeneidade do volume das plaquetas. O VPM (expresso em fL) representa o volume médio de cada plaqueta e é calculado, a partir do PCT e da contagem de plaquetas. No *Sysmex XN-550* a contagem de plaquetas é feita pela mesma metodologia que a contagem de eritrócitos, ou seja, por impedância elétrica. O estabelecimento de limites inferiores e limites superiores, permite a discriminação entre as plaquetas e os eritrócitos (Keohane, Smith & Walenga, 2016).

C. Esfregaço de Sangue Periférico

O esfregaço de sangue periférico é realizado sempre que seja requisitado, ou sempre que haja alterações nos valores obtidos pelos analisadores automáticos. Neste último caso, é particularmente tido em consideração o historial e a situação clínica do utente para suportar a sua concretização. No esfregaço é realizado a contagem e avaliação morfológica dos eritrócitos, leucócitos e das plaquetas (Keohane, Smith & Walenga, 2016).

No LACSM os esfregaços são preparados manualmente (**Anexo X**), a partir de amostras de sangue total em tubos com EDTA. Após a secagem do esfregaço este é corado pelo kit *Hemacolor® Rapid color of blood smear* (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), que se baseia no método de Pappenheim. Nesta coloração é usado um corante básico, o Azure B, e um corante ácido, a eosina. O corante básico (corante catiónico) confere uma cor azul a azul-violeta ao núcleo, devido à sua ligação com os grupos fosfato dos ácidos nucleicos. Essa cor também é conferida às nucleoproteínas, aos grânulos dos basófilos, e levemente aos grânulos

dos neutrófilos, e às plaquetas. Já o corante ácido (corante aniônico) confere uma coloração laranja ou vermelha à hemoglobina e aos grânulos dos eosinófilos. Este corante também se liga às proteínas catiónicas do núcleo, contribuindo para a coloração do mesmo (Bain, 2006).

Após preparação do esfregaço efetua-se a observação ao microscópico óptico começando por observar com a objetiva de 10x, depois com a de 40x, e por fim na de 100x e com óleo de imersão. Na observação com objetiva de 10x, avalia-se a qualidade do esfregaço de sangue, a qualidade da coloração, e avalia-se a distribuição das células. Com esta objetiva é possível observar a presença de eritrócito em *rouleaux*, agregados de eritrócitos, a presença de células anormalmente grandes, como os blastos, a presença de linfócitos reativos, e até mesmo a presença de parasitas. De seguida, com a objetiva de x40 é selecionada a área mais correta para a avaliação da morfologia celular, e para a realização da contagem diferencial dos leucócitos. A área mais correta para a realização da contagem diferencial de leucócitos consiste numa área com uma boa separação de eritrócitos e com uma sobreposição mínima dos mesmos. Por fim, com a objetiva de 100x com óleo de imersão é realizada a contagem diferencial de leucócitos, e é avaliada a morfologia dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas. A contagem diferencial de leucócitos, normalmente, consiste na contagem e qualificação de 100 leucócitos, de forma a obter as percentagens dos diferentes leucócitos (Keohane, Smith & Walenga, 2016).

Segunda a Norma n. °063/2011 da DGS (2011), são consideradas esfregaços com alterações patológicas, os estudos morfológicos do sangue periférico que apresentem a nível morfológico alterações dos eritrócitos e das plaquetas, sejam visualizados corpos de Döhle, granulações tóxicas ou vacúolos, e que se observe a presença de células blásticas, metamielócito, mielócitos, promielócitos, linfócitos atípicos, eritroblastos e/ou plasmócitos.

I. Avaliação da Série Eritrocitária

Na avaliação da morfologia dos eritrócitos existem cinco aspetos importantes a ter em consideração: a cor, o tamanho, a forma, a distribuição, e a presença de inclusões (Ford, 2013).

O eritrócito, ao ser observado ao microscópio óptico, tem uma forma circular com uma área central com palidez, devido à sua forma bicôncava (**Figura 8**). Esta área central mais pálida, normalmente, representa cerca de um terço do seu diâmetro. Quando a palidez passa a ocupar uma área maior do que um terço do seu diâmetro, diz-se que o eritrócito se encontra hipocrómico (**Figura 9**). A principal causa para a presença de eritrócitos hipocrómicos é uma baixa concentração de hemoglobina. Esta pode resultar de uma síntese inadequada de hemoglobina, que pode advir de uma falha na síntese de heme, sendo a anemia por deficiência em ferro a causa mais comum, mas também pode surgir na anemia sideroblástica e na inflamação crónica. Outra possível causa para a baixa

concentração de hemoglobina pode resultar de falha na síntese de globina, como observado nas talassemias (Bain, *et al.*, 2017).

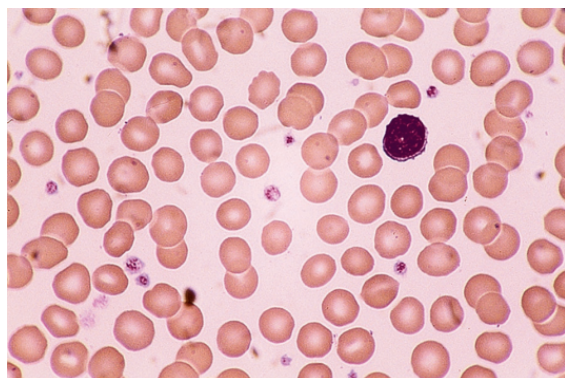


Figura 8 - Esfregaço de sangue periférico de um indivíduo adulto saudável (Bain, *et al.*, 2017).

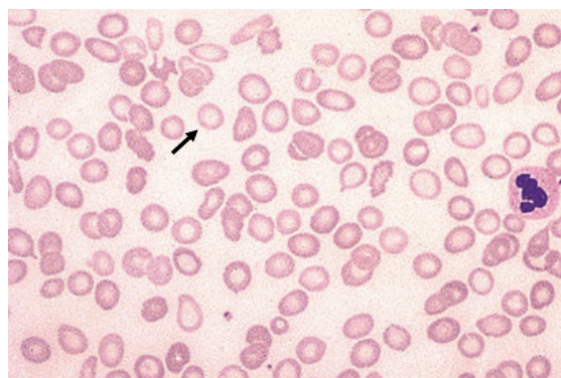


Figura 9 - Esfregaço de sangue com eritrócitos hipocrômicos, como o indicado pela seta (Adaptado de Bain, *et al.*, 2017).

Os eritrócitos também podem ser descritos como sendo hiperocrômicos. A utilização deste termo na descrição de um eritrócito observado num esfregaço não é tão comumente utilizada. Esta descrição é feita quando não é observada a presença de uma área central pálida e o eritrócito apresenta-se com uma coloração mais escura. A presença de hipocromia está associada a duas circunstâncias, à presença de macrócitos na anemia megaloblástica, ou à presença de eritrócitos anormalmente esféricos, que podem ser esferócitos, ou eritrócitos irregularmente contraídos (Bain, 2006; Bain, *et al.*, 2017).

Um outro termo utilizado para descrever os eritrócitos quanto à sua coloração é a policromasia (**Figura 10**). Este serve para descrever uma variabilidade na coloração dos eritrócitos. Esta variabilidade é resultado da presença de eritrócitos mais imaturos, os reticulócitos, que podem ser libertados da médula óssea e surgir no sangue periférico em condições onde há um persistente ou provisório stress hematopoiético (Bain, 2006).

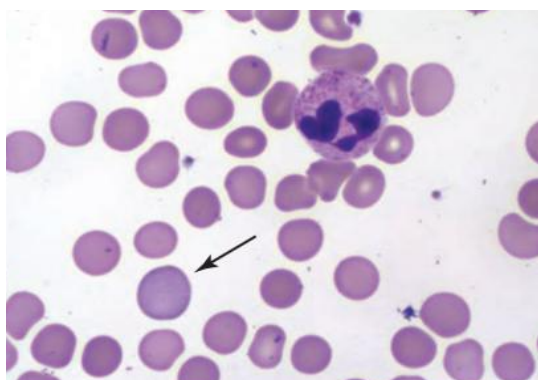


Figura 10 - Eritrócito policromático e macrocítico (indicado pela seta) (Adaptado de Ciesla, 2018).

Quanto à avaliação do tamanho de um eritrócito, este pode ser designado como sendo normocítico, macrocítico (**Figura 11A**) ou microcítico (**Figura 11B**). O eritrócito em condições normais apresenta um tamanho aproximado ao do núcleo de um linfócito, e designa-se como normocítico. Macrocitose é o termo utilizado para descrever um aumento no diâmetro dos eritrócitos. A macrocitose é uma condição fisiológica nos recém-nascidos, já nos adultos encontra-se associada a anemias megaloblásticas, anemias aplásicas, e em algumas hepatopatias. Por sua vez, a microcitose descreve eritrócitos com uma diminuição no seu diâmetro, e resulta de defeitos na formação da hemoglobina. A microcitose é característica da anemia por deficiência em ferro, de vários tipos de talassémias, e em casos severos de anemia da doença crônica. Quando no esfregaço é observado uma heterogeneidade no tamanho dos eritrócitos, tal é designado por anisocitose (Bain, *et al.*, 2017).

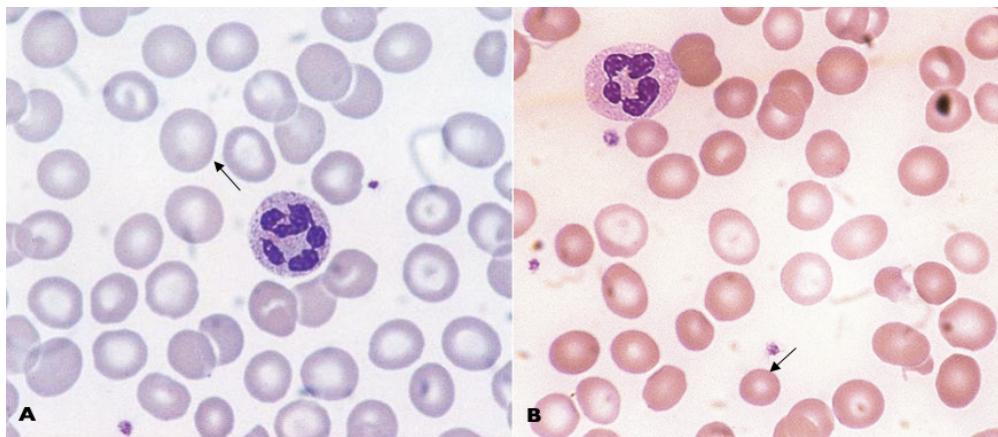


Figura 11 - Esfregaços de sangue com macrocitose (A) e microcitose (B). Eritrócito macrocítico (A) e microcítico (B) indicados pela seta (Adaptado de Bain, 2016. (A), e de Bain, *et al.*, 2017 (B)).

Além de alterações na cor e no tamanho dos eritrócitos também pode ocorrer alterações na sua forma, o qual é designado como poiquilocitose. A poiquilocitose pode advir tanto de uma anormal eritropoiese, como pode advir de alterações provocadas após a sua formação. Estas alterações na forma podem ser resultado de uma alteração intrínseca do eritrócito, como no caso de uma hemoglobinopatia, de um defeito na membrana, ou de um defeito enzimático que pode resultar num eritrócito mais propenso a uma alteração na sua forma. A poiquilocitose também pode resultar de fatores extrínsecos, tais como quando provocadas por drogas, químicos, toxinas ou pelo calor. As diferentes formas observadas são sugestivas de diferentes fatores etiológicos (Keohane, Smith & Walenga, 2016).

Os achados mais comuns na rotina laboratorial de eritrócitos com diferentes formas são os acantócitos, as células em alvo, os dacriócitos, os depreanócitos, os eliptócitos, os esferócitos, os esquizócitos, os equinócitos e os estomatócitos. No **Anexo XI** encontram-se

as respectivas características e associações clínicas destes eritrócitos com diferentes morfologias.

Nos eritrócitos também é possível a observação de inclusões, tais como, ponteados basófilos, corpos de Holly-Jowell, corpos de Heinz, corpos de Pappenheimer, parasitas entre outros. No ponteados basófilos, o eritrócito apresenta-se com grânulos finos azulados distribuídos pelo citoplasma, e estes resultam de RNA precipitado. Os corpos de Holly-Jowell são fragmentos de DNA, e os eritrócitos apresentam um grânulo ou múltiplos grânulos azuis a púrpura escura. Já os corpos de Heinz são inclusões, que resultam de hemoglobina desnaturada, e apresentam-se como um grânulo redondo ligado à membrana do eritrócito. Este só é visível com a utilização da coloração com azul metileno *de novo*. Já os corpos de Pappenheimer (ou siderócitos) são pequenos grânulos irregulares de ferro, que geralmente ficam corados de azul-claro a escuro e encontram-se na periferia do eritrócito (Keohane, Smith & Walenga, 2016).

No esfregaço de sangue periférico também é possível observar aglutinação eritrocitária e a formação de *rouleaux* eritrocitário. No *rouleaux* eritrocitário (**Figura 12**) os eritrócitos agregam-se em padrões lineares, aparentando-se como um empilhamento de eritrócitos. Esta pode dever-se a má preparação do esfregaço ou à observação do esfregaço numa zona demasiado espessa. Quando a formação de *rouleaux* eritrocitário está realmente presente, esta ocorre devido à perda da carga negativa dos eritrócitos, por aumento da presença de proteínas plasmáticas. O *rouleaux* eritrocitário está frequentemente associado a condições clínicas como o mieloma múltiplo, infeções crónicas e agudas, e em hepatopatias. Por sua vez, na aglutinação eritrocitária (**Figura 13**), esta resulta da presença de autoanticorpos do tipo IgM, os quais a temperaturas inferiores à 37°C, se ligam aos antígenos dos eritrócitos provocando a sua aglutinação. Quando esta aglutinação é observada as amostras são incubadas a 37°C, durante 30 minutos, a fim de se obterem resultados laboratoriais verídicos (Abramson, 2006; Gupta, 2014).

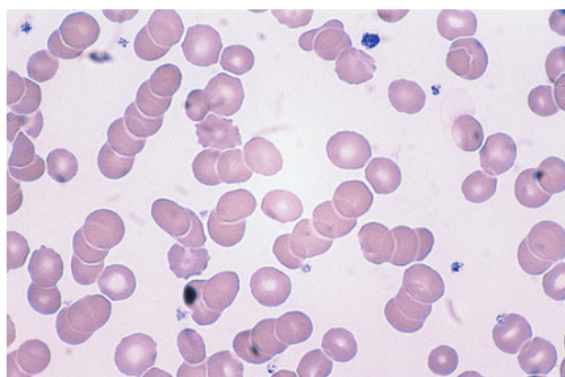


Figura 12 - Esfregaço de sangue periférico com *rouleaux* eritrocitário (Bain, et al. 2017).

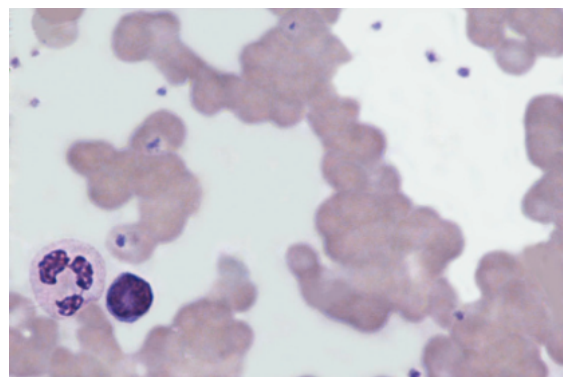


Figura 13 - Esfregaço de sangue periférico com aglutinação Eritrocitária (Bain, et al., 2017).

2. Avaliação da Série Leucocitária

Alterações nos leucócitos podem ser classificadas como quantitativas ou qualitativas. Nas quantitativas os valores dos leucócitos não se encontram dentro dos intervalos de referência. Já as alterações qualitativas ocorrem quando os leucócitos apresentam aparências fora do comum, ou quando células imaturas são encontradas na circulação (Blumenreich, 1990).

Na contagem de leucócitos, quando estes apresentam valores superiores aos de referência tal é designado de leucocitose. A leucocitose pode indicar a presença de infecção, inflamação de tecido, ou necrose de tecido associadas a condições como enfarte agudo do miocárdio, queimaduras, gangrena, leucemia, exposição a radiação, exposição a extremos de frio ou calor, ou linfoma, por exemplo. Já quando os valores se encontram inferiores aos do intervalo de referência estamos perante uma leucopenia. Esta resulta de uma diminuição na produção total dos leucócitos na medula óssea ou um aumento da destruição dos leucócitos. Os valores de leucócitos habitualmente diminuem em indivíduos após serem submetidos a radioterapia ou quimioterapia. Tanto na presença de leucocitose como leucopenia, a interpretação deve ser realizada em conjunto com os resultados da contagem diferencial para uma melhor discriminação das causas (Gay-George & Parker, 2003).

Na **Tabela 2** encontram-se as alterações dos números dos leucócitos e possíveis significados clínicos.

Tabela 2 - Alterações numéricas dos leucócitos e possíveis significados clínicos (Adaptado de Gay-George & Parker, 2003; Keohane, Smith & Walenga, 2016).

Tipo de Leucócito	Alteração Numérica	Significado Clínico
Neutrófilo	Neutrofilia ↑	Infeção aguda; inflamação; doenças mieloproliferativas; obesidade; tabagismo; queimaduras; gravidez; hemorragia.
	Neutropenia ↓	Infeção prolongada; fármacos (certos antimicrobianos, anti-inflamatórios, certos analgésicos, antidepressivos, anticonvulsivos, entre outros), doenças autoimunes.
Eosínfilo	Eosinofilia ↑	Alergias; parasitoses; doenças autoimunes.
	Eosinopenia ↓	Raro, dado a quantidade destes leucócitos na circulação periférica já ser normalmente baixa.
Basófilo	Basófilia ↑	Leucemia mielóide crónica; alergias; infeções crónicas; hipotiroidismo.

Tabela 2 (Continuação) - Alterações numéricas dos leucócitos e possíveis significados clínicos (Adaptado de Gay-George & Parker, 2003; Keohane, Smith & Walenga, 2016).

	Basopenia ↓	Raro, dado a quantidade destes leucócitos na circulação periférica já ser normalmente baixa.
Linfócito	Linfocitose ↑	Infeções virais agudas; leucemia linfocítica crónica.
	Linfopenia ↓	Infeção pelo Vírus da imunodeficiência Humana (HIV) e no Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA).
Monócito	Monocitose ↑	Infeções crónicas; linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin; lúpus eritematoso sistémico; Artrite reumatóide.
	Monocitopenia ↓	Corticosteróides; aplasia medular; Tricoleucemia.

A neutrofilia pode ser devida a um aumento de neutrófilos segmentados ou hipersegmentados (com mais de 5 lobos), o que é considerado um “desvio à direita”, ou com um aumento de neutrófilos em bastão, o que é considerado um “desvio à esquerda”. Estas observações são úteis para a identificação da causa desta leucocitose. Um “desvio à direita” é observado em condições, como queimaduras, artrite, hemorragia, e na anemia megaloblástica. Já um “desvio à esquerda” é, geralmente, observado quando há uma infeção bacteriana (Gay-George & Parker, 2003).

Algumas alterações morfológicas podem ser observadas nos neutrófilos, tais como, neutrófilos com granulações tóxicas, neutrófilos com vacúolos, e neutrófilos com corpos de Döhle. Os neutrófilos com granulações tóxicas aparecem durante processos infecciosos e representam, provavelmente, vacúolos fagocíticos. A presença de vacúolos nos neutrófilos é indicativa de sépsis, e quando em conjunto com granulações tóxicas pode ser resultado de uma intoxicação por álcool ou insuficiências hepáticas agudas. Já os corpos de Döhle são estruturas pequenas, redondas ou óvais, azuis pálidas, usualmente encontradas na periferia dos neutrófilos. Os corpos de Döhle consistem em ribossomas e retículo endoplasmático, e são observados em infeções bacterianas, reações leucemóides, e lesões nos tecidos, como no caso de queimaduras (Blumenreich, 1990; Bain, *et al.*, 2017).

Também podem ser observadas outras alterações nos polimorfonucleares, como é o caso da anomalia de May-Hegglin ou na anomalia de Pelger-Huët. A anomalia de May-Hegglin é caracterizada pela presença de corpos de inclusão largos no citoplasma dos polimorfonucleares, e é acompanhada de trombocitopenia e da presença de plaquetas

gigantes. Já na anomalia de Pelger-Huët o núcleo dos polimorfonucleares apresenta 2 lobos ligados por uma fina cromatina (Blumenreich, 1990).

Nos linfócitos também é possível observar alterações morfológicas, que ocorrem quando há infecções bacterianas e infecções virais. O linfócito reativo é a alteração mais comumente observada. Estes possuem um núcleo ligeiramente maior e possuem um citoplasma abundante e irregular, e são comumente encontrados na mononucleose infecciosa (Bain, *et al.*, 2017).

3. Avaliação da Série Plaquetária

Alterações no número de plaquetas e na morfologia das plaquetas fornecem informações importantes relativas a determinados processos patológicos. A trombocitose, isto é, o aumento do número de plaquetas, pode ser observado como uma resposta fisiológica ao stress físico, infecção, inflamação e em perdas crônicas de sangue. Em casos mais extremos, pode estar associada a doenças mieloproliferativas. Já a diminuição do número de plaquetas, a trombocitopenia, é uma alteração comumente detetada no laboratório, e deve ser sempre verificado se é uma verdadeira trombocitopenia, ou se é uma pseudotrombocitopenia. Na pseudotrombocitopenia observam-se frequentemente agregados plaquetários (**Figura 14**), mas também pode-se observar o satelitismo plaquetário (**Figura 15**). Estes fenómenos resultam de reações induzidas pelo ETDA. Os agregados plaquetários resultam da presença de autoanticorpos no plasma contra a glicoproteína IIb-IIIa que se encontra na superfície das plaquetas, o que conseqüentemente provoca a agregação plaquetar. Por sua vez, o satelitismo plaquetário consiste na observação de plaquetas aderidas aos neutrófilos. Este fenómeno resulta da presença de antígenos presentes na glicoproteína IIb-IIIa das plaquetas, que reagem simultaneamente com o recetor CD16 dos neutrófilos, resultando no satelitismo das plaquetas aos neutrófilos. Quando confirmada a pseudotrombocitopenia deve ser pedida nova colheita com um tubo com o anticoagulante de citrato de sódio ou com um tubo designado por *ThromboExact S-Monovette*[®]. Quando perante uma real trombocitopenia esta pode resultar

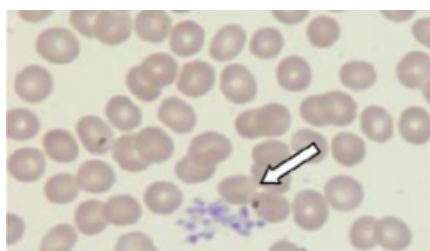


Figura 14 - Esfregaço de sangue periférico com a presença de um agregado plaquetar (indicado pela seta) (Kim, *et al.*, 2012).

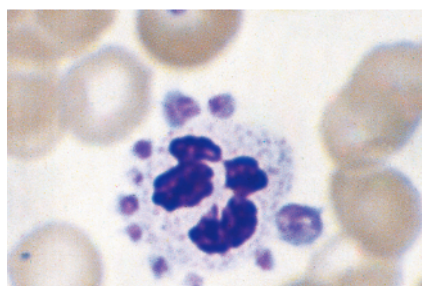


Figura 15 - Esfregaço de sangue periférico com satelitismo plaquetário (Bain, *et al.*, 2017).

de infecções por HIV, de quimioterapia, de presença de autoanticorpos ou de alcoolismo (Bain, et al., 2017; Gay-George & Parker, 2003; Paul, et al., 2013).

As alterações morfológicas que podem ser observadas nas plaquetas são relativas ao seu tamanho e aos seus grânulos, e estão associadas a certas condições clínicas. Plaquetas gigantes são observadas na Síndrome de Bernard-Soullier, e também são observadas na anomalia de May-Hegglin, como previamente referido. Já no Síndrome das plaquetas cinzentas observa-se, tal como o nome indica, a presença de plaquetas cinzentas, devido à presença de menos grânulos na sua constituição (Bain, et al, 2017).

D. Velocidade de Sedimentação dos Eritrócitos

A Velocidade de Sedimentação (VS) dos Eritrócitos é solicitada em conjunto com outros testes para detetar e monitorizar a evolução de condições inflamatórias como, artrite reumatoide, infecções e certas doenças malignas. No entanto, o VS não é um teste específico para doenças inflamatórias, e encontra-se elevado em muitas outras condições como no mieloma múltiplo, na anemia, e em situações fisiológicas, como a gravidez e o envelhecimento. Este teste devido à baixa especificidade e sensibilidade tem vindo a ser menos solicitado em detrimento de outros testes, como a determinação da Proteína C reativa, que é uma alternativa mais fiável para monitorizar processos inflamatórios (Keohane, Smith & Walenga, 2016).

O princípio deste teste consiste em permitir a sedimentação dos eritrócitos no plasma de uma amostra de sangue anticoagulado num tubo vertical, e à temperatura ambiente, durante cerca de 60 minutos. O parâmetro é então a distância percorrida, em milímetros, pelos eritrócitos sob a influência da gravidade, em 60 minutos. Os eritrócitos possuem na sua superfície uma rede de carga negativa que os repele uns aos outros. As forças de repulsão são parcialmente ou totalmente neutralizadas quando há um aumento de proteínas plasmáticas de carga positiva, como o fibrinogénio, β -globulinas e imunoglobulinas. Perante estas condições os eritrócitos sedimentam mais rapidamente em resultado do empilhamento dos eritrócitos (*rouleaux*), devido às alterações provocadas na superfície dos mesmos (Keohane, Smith & Walenga, 2016).

No LACSM, a VS é determinada pelo analisador *VES-MATIC CUBE 30* (DIESSE Diagnostica Senese S.p.A., Siena, Itália), que se baseia no método de Westergren. Este analisador agita as amostras, de forma a obter uma suspensão homogénea de eritrócitos antes de realizar a análise. No analisador, a VS é determinada nos tubos com EDTA, através da leitura por um

sensor óptico-elétrico, com o qual é registada a diferença da altura dos eritrócitos no tubo antes e depois da sedimentação, sendo que os resultados são obtidos ao fim de 30 minutos. Os resultados são obtidos em menos tempo, devido ao posicionamento dos tubos a um ângulo de 18 graus em relação a um eixo vertical, sendo que os valores são posteriormente extrapolados tendo o método Westergren como referência (Pieri, *et al.*, 2021; Keohane, Smith & Walenga, 2016).

E. Hemostase

A hemostase é um processo fisiológico complexo com importantes e variadas funções. Estas consistem em garantir a manutenção do sangue circulante num estado fluído no sistema vascular, assim como num conjunto de mecanismos que, de modo integrado, contribuem para rapidamente parar uma hemorragia, atuando localmente, e de modo autolimitado, de forma a não comprometer o normal fluxo sanguíneo. Existem vários componentes fundamentais para garantir o equilíbrio destes mecanismos. Estes são as células endoteliais que constituem a parede do vaso, as plaquetas, os fatores de coagulação, os inibidores de coagulação e o sistema fibrinolítico (Bain, *et al.*, 2017; Keohane, Smith & Walenga, 2016).

Perante uma lesão vascular, imediatamente ocorre a vasoconstrição, a fim de reduzir o fluxo sanguíneo no local da lesão. Adicionalmente, o colagénio e o factor tecidual (TF) entram em contacto com o fluxo sanguíneo. O colagénio exposto estimula a acumulação e ativação das plaquetas no local da lesão, com consequente adesão e agregação das mesmas. Enquanto isso, a cascata de coagulação (**Figura 16**) inicia-se pela interação do TF com o fator VII. O complexo TF-fator VII ativo (VIIa), ativa tanto o factor IX como o factor X. Na via extrínseca o factor X ativo (Xa) forma pequenas quantidades de trombina, a partir da protrombina, o que não é suficiente para iniciar uma polimerização significativa de fibrina. A produção de trombina agora é dependente da via “intrínseca”. Nesta os fatores VIII e V são ativados pelas pequenas quantidades de trombina gerada durante a iniciação. A via “intrínseca” é uma fase de amplificação, na qual o complexo IXa-VIIIa na presença de cálcio ativa quantidades suficientes de factor Xa, que em combinação com o fator Va, com fosfolípidos e com cálcio, forma o complexo protrombinase, o que resulta numa grande produção de trombina. A trombina, por sua vez, hidrolisa o fibrinogénio, libertando fibrinopeptídeos A e B, formando monómeros de fibrina. Estes monómeros espontaneamente ligam-se através de pontes de hidrogénio formando um polímero de fibrina solúvel. O factor XIII, ao ser ativado pela trombina estabiliza os polímeros de fibrina, resultando num coágulo de fibrina de insolúvel (Zaidi & Green, 2019; Hoffbrand & Moss, 2016).

Após a hemostase, é necessário então ocorrer a dissolução do coágulo e restauração do fluxo sanguíneo. Este processo de dissolução do coágulo é designado de fibrinólise. A fibrinólise é ativada igualmente pela lesão vascular, e requer a conversão do plasminogénio em plasmina, que por sua vez hidrolisa a fibrina. Na sequência da fibrinólise, forma-se os fragmentos solúveis de fibrina que são posteriormente eliminados do organismo (Zaidi & Green, 2019).

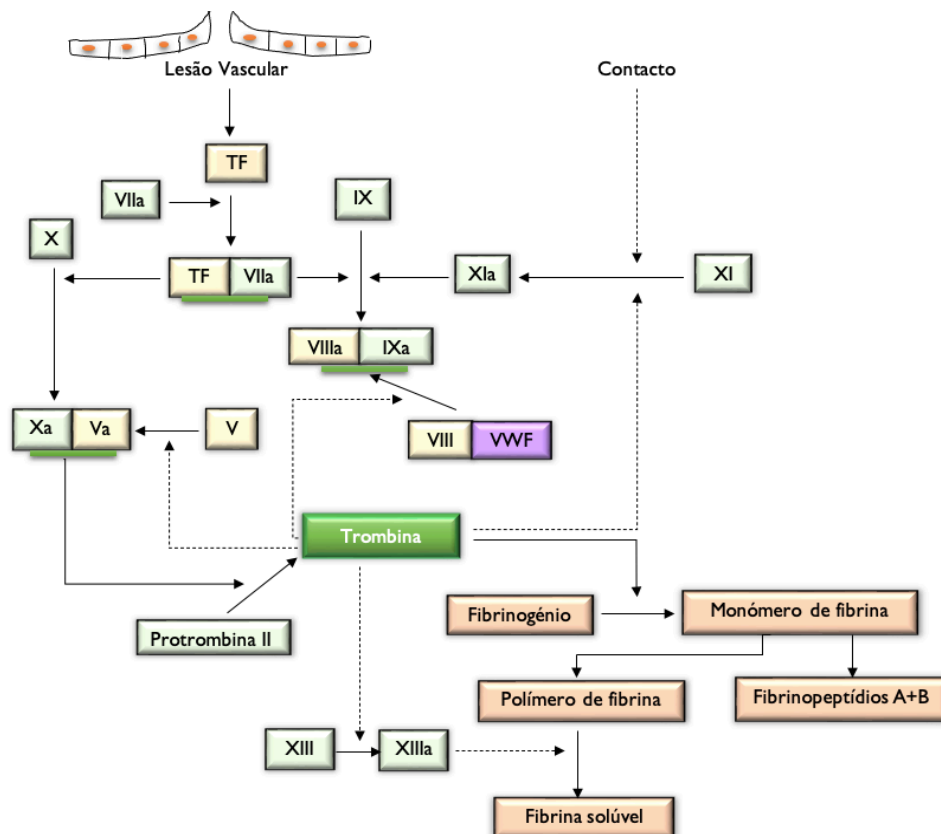


Figura 16 - Cascata de coagulação *in vivo* é iniciada pelo Fator Tecidual (TF). Quando o plasma entra em contacto com o TF, o factor VII liga-se. Este complexo TF-VII ativado (VIIa) ativa o factor X e o XI. A formação de trombina a partir de protrombina pela ação do complexo Xa-Va leva à formação de fibrina. A trombina também ativa os fatores XI, VIII, V e XIII (linha a tracejado). A separação entre o fator VIII e a sua proteína transportadora, o fator 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 ação da trombina resulta na formação de fibrina, que origina coágulo de fibrina solúveis. Adaptado de: Hoffbrand & Moss, 2016.

I. Testes de *screening* da coagulação

Os testes de *screening* de coagulação permitem avaliar a via extrínseca e a via intrínseca da coagulação, assim como a conversão de fibrinogénio em fibrina (Hoffbrand & Moss, 2016).

Para a realização do *screening* de coagulação usa-se o plasma obtido a partir de sangue total colhido para o tubo com citrato de sódio. Outros anticoagulantes como o EDTA e a heparina inibem diretamente o processo de coagulação e interferem com as determinações finais. Já o uso de citrato de sódio como anticoagulante tem o benefício adicional de que com o uso deste o cálcio é mais rapidamente neutralizado. Posteriormente, no momento da

realização dos testes, ao adicionar cálcio o seu efeito anticoagulante é facilmente revertido (Bain, et al., 2017).

No LACSM a avaliação do Tempo de Protrombina (TP), Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (aPTT) e fibrinogénio é realizado nos analisadores automatizados *Sysmex CA-540* e *Sysmex CA-660* (*Sysmex Corporation*, Kobe, Japão). Estes equipamentos são utilizados em dias alternados, mas é sempre realizada a manutenção e o controlo diário de ambos. Estes equipamentos têm por base o método de turbidimetria, baseado na deteção foto-óptica do coágulo. O aumento da turvação durante a formação do coágulo de fibrina é então medido como um aumento na intensidade de luz dispersa quando a amostra é exposta a uma luz com um comprimento de onda de 660 nm (Bain, et al., 2017).

a) Tempo de Protrombina

O TP avalia a integridade da via extrínseca (factor VII) e da via comum (factor II, V, X e fibrinogénio). O TP consiste no tempo que leva à formação de um coágulo no plasma, após a adição de cálcio e de tromboplastina tecidular. O TP é reportado na forma da Razão Internacional Normalizada (INR), que consiste no quociente entre o TP do utente e o TP do controlo, elevado ao Índice de Sensibilidade Internacional (ISI) do reagente de tromboplastina em uso. Assim, é possibilitado a que a monitorização da terapêutica seja concretizada de forma coerente, dado diferentes laboratórios usarem diferentes reagentes (DeLoughery, 2019; Marcucci, & Schoettker, 2015).

Quando o TP se encontra prolongado as condições clínicas mais comumente associadas são a deficiência da vitamina K, devido ao uso de wafarina, que é um anticoagulante oral antagonista da vitamina k, ou pode ser devido à ingestão inadequada de vitamina K. Também pode estar prolongado perante uma hepatopatia e na coagulação intravascular disseminada (Deloughery, 2019).

b) Tempo de Tromboplastina Ativada

O aPTT avalia a integridade da via intrínseca (factores VIII, IX, XI, XII) e comum (II, V e fibrinogénio). O tempo de coagulação é medido após a ativação de fatores de contacto, e da adição de cloreto de cálcio e de fosfolípidos (Marcucci, & Schoettker, 2015).

Existem quatro condições clínicas a considerar quando o aPTT está prolongado. São estas: a deficiência de um ou mais factores da via intrínseca e/ou comum, como na hemofilia A, em que há deficiência do factor VIII, ou na Hemofilia B onde há deficiência do factor IX, ou na doença de Von Willebrand, em que há um défice da proteína transportadora do factor VIII;

a presença de anticorpos antifosfolípido, o quais podem advir-se de uma doença autoimune; a inibição de factores de coagulação, pois em certas condições clínicas há a presença de anticorpos específicos contra certos factores, como no caso do fator VIII, ou então podem ser encontrados em doentes hemofílicos; e por fim, o uso de heparina ou outros anticoagulantes pode resultar num aPTT prolongado (DeLoughery, 2019; Marcucci & Schoettker, 2015).

c) Fibrinogénio

A determinação da concentração de fibrinogénio é realizada tendo por base o princípio de Clauss. Neste uma elevada concentração de trombina é adicionada ao plasma diluído, sendo que o tempo de coagulação será inversamente proporcional à concentração de fibrinogénio no plasma (Marcucci & Schoettker, 2015).

O fibrinogénio é uma proteína de fase aguda, e pode estar aumentada em fases iniciais de uma hepatopatia, ou diminuído em casos severos de hepatopatia, nos quais o fígado produz fibrinogénio em quantidades normais, mas encontra-se funcionalmente alterado, sendo esta uma patologia designa-se por disfibrinogenemia (Keohane, Smith & Walenga, 2016).

XIII. Casos Clínicos

A. Caso Clínico I

Um rapaz de 9 anos deu entrada na urgência pediátrica com uma dor abdominal. Foi analisado o sangue total, o soro, e foi realizada uma urocultura e uma coprocultura.

Na **Tabela 3** encontram-se os resultados analíticos do sangue total e do soro.

Tabela 3 - Resultados laboratoriais obtidos.

Parâmetros	Resultados	Unidades	Valores de Referência
ERITROGRAMA			
Eritrócitos	4,05	$\times 10^{12}/L$	4,00-5,90
Hb	10,8 ↓	g/dL	13,5-17,5
HCT	33,2 ↓	%	41,0-53,0
VGM	82	fL	80-100
HGM	27	pg	26-34
CHGM	33	g/dL	32-36
RDW	12.9	%	11,6-14,0

Tabela 3 (Continuação) - Resultados laboratoriais obtidos.

LEUCOGRAMA			
Leucócitos	6,57	×10 ⁹ /L	4,0-10,00
Neutrófilos	35,2 (2,31)	%	1,80-7,00
Eosinófilos	4,4 (0,29)	%	< 0,50
Basófilos	0,6 (0,04)	%	< 0,10
Linfócitos	54,2 (3,56)	%	1,00-4,00
Monócitos	5,6 (0,37)	%	0,20-1,00
Plaquetas			
	443 ↑	×10 ⁹ /L	150-400
Linfócitos Ativados, Pesquisa	Negativo/a		
BIOQUÍMICA			
Glucose	93	mg/dL	74-106
Ureia	33	mg/dL	19-49
Creatinina	0,53	mg/dL	0,70-1,30
Bilirrubina Total	0,33	mg/dL	0,30-1,20
Bilirrubina Conjugada	0,09	mg/dL	≤0,30
Aspartato-aminotransferase (AST)	42 ↑	UI/l	<34
Alanina-Aminotransferase (ALT)	26	UI/l	10-49
Lactato Desidrogenase (LDH)	462 ↑	UI/l	208-378
Creatina Quinase (CK)	192 ↑	UI/l	46-171
Ionograma (Na, K, Cl)			
Sódio (Na)	140	mmol/L	132-146
Potássio (K)	4,4	mmol/L	3,5-5,5
Cloro (Cl)	106	mmol/L	99-109
Proteína C Reativa	0,2	mg/L	<5,0

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

Os resultados analíticos revelaram que os valores da Hb e do HCT estavam abaixo dos valores de referência. Esta diminuição pode ser resultado de hemodiluição, em consequência de uma possível terapia com fluídos. Ou pode ser resultado de uma anemia normocítica e normocrômica, dado os valores do VGM e do CHGM, respetivamente, estarem dentro dos intervalos de referência. O pedido da contagem de reticulócitos e o estudo morfológico do sangue periférico iriam ajudar no diagnóstico diferencial da etiologia da anemia normocítica normocrômica, a qual pode se tratar de uma anemia hemolítica, ou de uma anemia da doença crónica, entre outras (Keohane, Smith & Walenga, 2016).

O valor das plaquetas está acima dos valores de referência. Esta trombocitose pode estar associada à presença de uma infeção ou inflamação que possa estar a resultar na dor abdominal sentida pelo paciente.

A AST é uma enzima que se encontra em diversos tecidos como o coração, fígado, músculo esquelético, eritrócitos, entre outros. Pelo que, o seu aumento relativo aos valores de referência, sem estar associado com aumento nos valores da enzima ALT, apenas permite inferir que não há lesão hepatocelular. O LDH é uma enzima citoplasmática igualmente inespecífica apresentando uma ampla distribuição tecidual, sendo que o seu aumento apenas é indicativo de lesão tecidual. Por último, o valor da CK encontra-se acima dos valores de referência. Esta enzima encontra-se presente no músculo esquelético, no cardíaco e no cérebro, pelo que dado tratar-se de uma criança este valor poderá ser fisiológico, ou referente a uma lesão muscular ou a excesso de exercício físico.

O exame sumário à urina não revelou nenhuma alteração, e o exame cultural à urina foi negativo. Já na coprocultura, observou-se o crescimento de colónias com um centro preto no meio SS (**Figura 17**). Colónias com um centro preto no meio SS é indicativo de um microrganismo produtor de H₂S, como é o caso de algumas estirpes de *Salmonella*. Estes microrganismos formam colónias com um centro preto, devido à presença da enzima tiosulfato redutase na sua constituição. Esta enzima ao reduzir o tiosulfato de sódio, presente no meio, resulta na formação de H₂S. O H₂S ao reagir com o ião férrico, presente no citrato de ferro amoniacal, forma um precipitado negro, o sulfureto ferroso. De forma a obter a correta identificação e o antibiograma recorreu-se ao VITEK®2 Compact, utilizando as cartas GN e AST-N359.



Figura 17 - Colónias com um centro preto no meio SS (Fotografia registada no LACSM).

Obteve-se a identificação como sendo uma bactéria do género da *Salmonella*, pelo que para confirmação da identificação e obtenção da serotipagem, um meio de cultura com colónia pura foi enviado para o Laboratório de Análises Clínicas SYNLAB em Lisboa e foi feita a

notificação ao INSA. Os antibióticos que foram validados, por se tratar de uma criança, foram a Amoxicilina e o Trimetroprim+Sulfametoxazol.

A identificação final do agente etiológico foi a de *Salmonella enterica* serovar Duesseldorf. O diagnóstico final foi uma gastroenterite aguda por infecção por *Salmonella enterica*.

A maioria das estirpes de *Salmonella* são sensíveis ao ácido do estômago, pelo que milhões de bactérias têm que ser ingeridas para um número suficiente sobreviver e ultrapassar o estômago, e por sua vez, colonizar os intestinos. As bactérias ao chegarem à parte terminal do intestino delgado, ligam-se a recetores específicos na superfície das células epiteliais. O contacto ativa o sistema de secreção do tipo III, o qual transfere proteínas efectoras para as células epiteliais. As bactérias são envolvidas pela célula por endocitose. Estas multiplicam-se no fagossoma formado, provocando a morte da célula hospedeira e disseminando-se pelas células vizinhas. Habitualmente, a infecção mantém-se localizada às células intestinais. E a resposta inflamatória é a responsável pela ocorrência de diarreia e dores abdominais, algumas das manifestações clínicas, frequentemente, observadas nestes quadros clínicos. Tal está associado à resposta inflamatória na qual ocorre a produção de prostaglandinas e a estimulação de adenilciclase, o que resulta na secreção de fluidos, causando a diarreia (Nester, Anderson, & Roberts, 2011). A patogénese da invasão por *Salmonella* pode justificar a elevação de algumas das enzimas celulares observadas nos resultados analíticos decorrentes da destruição das células epiteliais do intestino.

B. Caso Clínico 2

Um homem de 52 anos recorreu ao serviço de urgência do HPM, no dia 23 de abril de 2022 na sequência de um desmaio.

Na **Tabela 4** encontram-se os resultados laboratoriais à admissão no serviço de urgência.

Tabela 4 - Resultados Laboratoriais à admissão no serviço de urgências.

Parâmetros	Resultados	Unidades	Valores de Referência
ERITROGRAMA			
Eritrócitos	3,45 ↓	x10 ¹² /L	4,50-5,90
Hb	6,4 ↓	g/dL	13,5-17,5
HCT	22,4 ↓	%	41,0-53,0
VGM	65 ↓	fL	80-100
HGM	19 ↓	pg	26-34

Tabela 4 (Continuação) - Resultados Laboratoriais à admissão no serviço de urgências.

CHGM	29 ↓	g/dL	32-36
RDW	18,9 ↑	%	11,6-14,0
LEUCOGRAMA			
Leucócitos	6,89	×10 ⁹ /L	4,00-10,00
Neutrófilos	6,9 (4,26)	%	1,80-7,00
Eosinófilos	0,9 (0,06)	%	< 0,50
Basófilos	0,7 (0,05)	%	< 0,10
Linfócitos	24,7 (1,70)	%	1,00-4,00
Monócitos	11,8 (0,81)	%	0,20-1,00
BIOQUÍMICA			
Plaquetas	332	×10 ⁹ /L	150-400
Glucose	97	mg/dL	74-106
Ureia	47	mg/dL	19-49
Bilirrubina Total	0,83	mg/dL	0.30-1.20
Bilirrubina Conjugada	0,22	mg/dL	<=0.30
Creatinina	0,84	mg/dL	0,70-1,30
Colesterol da fração HDL	68	mg/dL	>40
Ferro Sérico	7 ↓	μg/dL	65-175
Ferritina	2,6 ↓	μg/L	22,0-322,0
AST	26	UI/l	<34
ALT	21	UI/l	10-49
Fosfatase Alcalina	69	UI/l	46-116
CK	108	UI/l	46-171
CK Fração MB (massa)	<0,2	ng/mL	<5,0
Nt-proBNP	44	pg/mL	<125
Amilase	114	UI/L	30-118
Ionograma (Na, K, Cl)			
Sódio (Na)	142	mmol/L	132-146
Potássio (K)	4,8	mmol/L	3,5-5,5
Cloro (Cl)	108	mmol/L	99-109
Magnésio (Mg)	2.2	mg/dL	1,3-2,7
Proteína C Reativa	0,1	mg/L	<5,0
Proteínas totais	7,1	g/dL	5,7-8,2
Albumina	4,4	g/dL	3,2-4,8

Adaptado do boletim clínico obtido no Laboratório de Análises Clínicas

As análises clínicas realizadas no contexto de urgência revelaram uma anemia microcítica e hipocrômica, uma vez que apresentava valores de hemoglobina, VGM e CHGM inferiores aos valores de referência.

A anemia microcítica e hipocrômica é causada por condições que resultam numa reduzida síntese de hemoglobina. Estas podem ser a deficiência de ferro, a anemia da doença crónica, a anemia sideroblástica e nas talassémias. A deficiência de ferro é a causa mais comum da anemia microcítica e hipocrômica, na qual os valores do ferro são insuficientes para manter uma normal eritropoiese (Keohane, Smith, & Walenga, 2016).

Segundo Norma n. °030/2013 da DGS (2013), perante uma suspeita de deficiência de ferro esta deve ser confirmada laboratorialmente com o hemograma (HCT, Hb, VGM, HGM, CMHG, RDW), a contagem dos reticulócitos e parâmetros do metabolismo do ferro [ST=ferro/CTFF, Ferritina]. Destes parâmetros, no dia de entrada no serviço de urgência foram todos solicitados, à exceção da contagem dos reticulócitos, do CTFF e do ST.

O utente foi internado, e os parâmetros requeridos nas análises realizadas durante o período de internamento encontram-se na **Tabela 5**. Também estão os resultados do dia de admissão das urgências, 23/04, para comparação. Na requisição das análises já havia o comentário de que se tratava de uma anemia por deficiência em ferro em estudo. No dia 25/04 também foi solicitada a análise sumária da urina a qual não acusou nenhuma alteração, nem presença de elementos anormais.

Tabela 5 - Resultados Laboratoriais obtidos durante o período de internamento.

Parâmetros	Resultados					Unidades	Valores de Referência
	23/04	25/04	27/04	28/04	02/05		
ERITROGRAMA							
Eritrócitos	3,45 ↓	3,77 ↓	4,10 ↓	3,74 ↓	3,95 ↓	x10 ¹² /L	4,50-5,90
Hb	6,4 ↓	7,3 ↓	8,1 ↓	7,6 ↓	8,3 ↓	g/dL	13,5-17,5
HCT	22,4 ↓	25,1 ↓	27,9 ↓	25,9 ↓	28,9 ↓	%	41,0-53,0
VGM	65 ↓	67 ↓	68 ↓	69 ↓	73 ↓	fL	80-100
HGM	19 ↓	19 ↓	20 ↓	20 ↓	21 ↓	pg	26-34
CHGM	29 ↓	29 ↓	29 ↓	29 ↓	29 ↓	g/dL	32-36
RDW	18,9 ↑	20,9 ↑	22,1 ↑	22,4 ↑	28,8 ↑	%	11,6-14,0
BIOQUÍMICA							
Ferro Sérico	7 ↓	595 ↑	292 ↑			µg/dL	65-175
Ferritina	2,6 ↓	88	467 ↑			µg/L	22,0-322,0
CTFF		365				µg/dL	250-425
ST		100 ↑	69 ↑			%	20-50

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

No estudo da anemia por deficiência de ferro são estudados os parâmetros do metabolismo do ferro, a fim de a diferenciar das outras condições que estão na origem da anemia microcítica e hipocrômica. O ferro sérico é referente à quantidade de ferro ligada à proteína transportadora, a transferrina, presente no soro. A CTFF mede indiretamente a Transferrina e os locais de ligação disponíveis para o ferro no plasma. A ST é calculada a partir do ferro total e da CTFF. A ferritina é o melhor indicador da deficiência de ferro, e um baixo valor de ferritina é indicativo de uma anemia por deficiência de ferro. O ferro é armazenado intracelularmente como ferritina, e aquando da presença de infeção, malignidades ou doença inflamatória crónica, os valores de ferritina sobem, pois a ferritina é uma proteína de fase aguda positiva (Bouris & Martin, 2018; Keohane, Smith, & Walenga, 2016).

A anemia por deficiência de ferro, tipicamente, apresenta-se com valores de ferro sérico, ferritina e ST inferiores aos valores de referência, e com a CTFF superior aos valores de referência. Neste caso clínico, o valor do ferro sérico está diminuído o que permite excluir então a hipótese de se tratar de uma anemia sideroblástica ou de uma talassémia. Por sua vez, o baixo valor de ferritina permite excluir a outra condição responsável pela anemia microcítica e hipocrômica, que se trata da anemia da doença crónica. Tendo em conta os resultados do hemograma, e os parâmetros relativos ao metabolismo de ferro confirma-se então o diagnóstico de anemia por deficiência do ferro. Apesar do esfregaço de sangue periférico (**Figura 18**) só ter sido realizado nas análises do 5º dia de internamento, a 28/04, a observação deste confirmou a microcitose e hipocromia indicada pelos valores obtidos no hemograma. Também foi possível visualizar nos diferentes campos uma heterogeneidade no tamanho dos eritrócitos, a qual é denominada de anisocitose, sendo que esta corresponde a um RDW elevado, tal como indicado no hemograma do paciente. Na observação dos diferentes campos foram também visualizadas células em alvo.

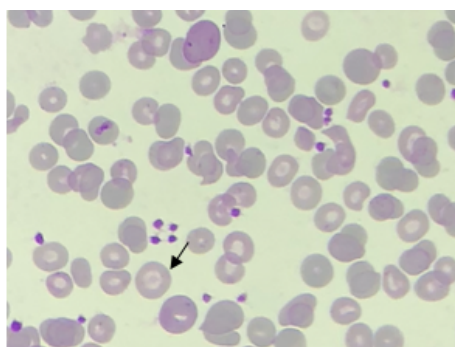


Figura 18 - Estudo morfológico do sangue periférico. Observa-se uma moderada hipocromia e a presença de eritrócitos microcíticos. Observa-se também uma anisocitose (eritrócitos com diferentes tamanhos) e uma ligeira poiquilocitose (eritrócitos com diferentes formas). Também são visíveis células em alvos (indicado pela seta). Ampliação de 100x. (Fotografia obtida no Laboratório SYNLAB Madeira).

A hipocromia e microcitose indicadas pelo hemograma e confirmadas no esfregaço, e o elevado valor de RDW corroboram com o diagnóstico de anemia por deficiência de ferro.

Não houve acesso à terapêutica instituída, mas segundo a Norma n. °030/2013 da DGS (2013), em casos de anemia grave com compromisso de atividades de vida diária ou necessidade de recuperação hematológica rápida, deve ser administrado ferro endovenoso, ou em utentes sintomáticos e/ou com necessidade de aumento rápido da Hb deve ser prescrita a transfusão. No 2º dia de internamento, 25/04, observou-se um abrupto aumento do ferro sérico, e um conseqüente aumento das reservas do ferro, a ferritina, que passaram a estar com valores dentro dos de referência, no entanto os parâmetros do eritrograma mal sofreram alterações. Estes aumentos abruptos do parâmetro do ferro sérico e ferritina poderão ser justificados por uma terapêutica com ferro endovenoso. A CTFE encontrava-se dentro dos valores de referência, e a ST estava o dobro do valor do limite superior de referência. É de ressaltar que a ST corresponde à percentagem da proteína transportadora de ferro no soro (transferrina), que se encontra saturada com ferro. O elevado valor do ST é então justificado pelo excesso de ferro no soro do paciente. No 4º dia de internamento, 27/04, os valores do ferro sérico e da ferritina já tinham diminuído quase para metade dos valores obtidos no 2º dia de internamento e, por consequência, o valor de ferritina aumentou abruptamente, o que traduz o aumento do ferro armazenado intracelularmente. Contudo, no decorrer dos diferentes dias não se observaram grandes alterações nos diversos parâmetros hematológicos, o que reforça a necessidade do diagnóstico da etiologia da anemia.

A história clínica e os antecedentes pessoais são fundamentais na investigação da causa da anemia por deficiência por ferro. Esta pode resultar de várias causas, como ingestão oral subótima de ferro, má absorção de ferro oral (doença celíaca, infecção por *Helicobacter pylori*, gastrectomia total ou parcial, uso de anti-inflamatórios não esteróides, dádivas de sangue, hematuria, perdas hemáticas crônicas com origem no sistema gastrointestinal, entre outras origens (Goddard, et al., 2011).

Não houve acesso aos exames complementares realizados ao paciente. No entanto, a exclusão de hematuria como causa é facilmente justificável por não ter sido detetada a presença de sangue na análise sumária da urina. A infecção por *H.pylori* pode ser facilmente rastreada recorrendo ao teste da ureia no ar exalado (método não invasivo). A doença celíaca pode ser diagnosticada recorrendo a um exame serológico, no qual são detetados os anticorpos IgA-antitransglutaminase e anticorpo IgA-antigliadina desamidada. Já a investigação de perdas hemáticas com origem no sistema gastrointestinal é, por sua vez, realizada recorrendo à endoscopia alta e colonoscopia (Goddard, et al., 2011). Esta última permite a deteção, por exemplo, de neoplasias, como a neoplasia do cólon, a qual na requisição do dia 02/05 já aparecia como diagnóstico final do paciente.

XIV. CONCLUSÃO

O Mestrado em Análises Clínicas na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra é, sem dúvida, uma fonte de enorme conhecimento teórico dos processos biológicos e fisiológicos do ser humano e dos distúrbios que o podem afetar. As componentes teóricas e práticas, que foram lecionadas no decorrer do mestrado, foram fundamentais para me proporcionar as bases necessárias para o meu futuro nesta área.

A enorme oportunidade que tive em estagiar no SYNLABHEALTH MADEIRA foi uma mais-valia, que me permitiu um enorme crescimento a nível do meu conhecimento na prática laboratorial, bem como permitiu-me solidificar e enriquecer o meu conhecimento científico. Com este estágio tive a oportunidade de experienciar um ambiente, que concilia o trabalho árduo e em equipa, com uma enorme boa disposição.

O estágio permitiu-me ver a realidade que me foi sendo transmitida ao longo do mestrado e o enorme impacto que tem o papel dos técnicos e do laboratório no diagnóstico, na prevenção, e na monitorização da evolução da doença e do seu tratamento. Sem dúvida, que hoje em dia o laboratório está largamente automatizado, mas o papel de um técnico superior em análises clínicas é crucial para garantir a manutenção e monitorização destes equipamentos e interpretação dos resultados obtidos, e requer sempre um espírito crítico e conhecimento multidisciplinar nas diferentes áreas que abrangem a saúde humana para a validação analítica, com o objetivo final de contribuir para a saúde da pública.

XV. REFERÊNCIAS

ABRAMSON, N. (2022) - **Rouleaux formation**. The American Society of Hematology. Vol. 107. n°11, (2022), p. 4205. [Acedido a 20 de junho de 2022]. Disponível na Internet: <https://ashpublications.org/blood>

ALAVI, N. [et al.] (2020) - **Challenges in Preanalytical Phase of Laboratory Medicine: Rate of Blood Sample Nonconformity in a Tertiary Care Hospital**. The electronic Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Vol. 31, n°1(2020), p.21–27. [Acedido a 25 de junho de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.ifcc.org/ifcc-communications-publications-division-cpd/ifcc-publications/ejifcc-journal/>

BADOUX, P. [et al.] (2020) - Method Comparison of the ImmuView *L. pneumophila* and *L. longbeachae* Urinary Antigen Test with the BinaxNOW Legionella Urinary Antigen Card for Detection of Legionella pneumophila Serogroup I Antigen in Urine. Journal of Clinical Microbiology. Vol 58, n°3 (2020), p.1-9. [Acedido a 19 de fevereiro de 2022]. Disponível na Internet: <https://journals.asm.org/journal/jcm>

BAIN, B. J. (2006) - **Blood Cells: A Practical Guide**. 4ªEd. Massachusetts, EUA: Blackwell publishing, 2006. ISBN: 978-1-4051-4265-6.

BAIN, B. J. [et al.] (2017) - **Dacie and Lewis Practical Haematology**. 12ªEd. China: Elsevier Churchill Livingstone, 2017. ISBN: 978-0-7020-6696-2.

BANFI, G.; Salvagno, G. L.; Lippi, G. (2007) - **The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes**. Clinical Chemical Laboratory Medicine. Vol. 45, n°5 (2007), p. 565-576. [Acedido a 18 de junho de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.degruyter.com/journal/key/cclm/html>

BEHZADI, P.; BEHZADI, E. (2008) - **The Microbial Agents of Urinary Tract Infections at Central Laboratory of Dr. Shariati Hospital, Tehran, IRAN**. Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences. Vol. 28, n°4 (2008), p.445. [Acedido a 14 de fevereiro de 2022]. Disponível na internet: <https://www.turkiyeklinikleri.com/>

BEGEMANN, H.; RASTETTER, J. (1979) - **Staining Methods**. In: BEGEMANN, H.; RASTETTER, J. Atlas of Clinical Hematology. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 1979, ISBN: 978-3-642-96527-2, p.9-23.

BLUMENREICH, M. S. (1990). - **The White Blood Cell and Differential Count**. In: BLUMENREICH, M. S. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations, Boston: Butterworths Publisher, 1990, ISBN: 10: 0-409-90077-X, p.724-727.

BOURI, S.; MARTIN, J. (2018). - **Investigation of iron deficiency anaemia**. Clinical Medicine. Vol. 18, nº3 (2018), p.242-244. [Acedido a 6 de junho de 2022]. Disponível na internet: <https://www.rcpjournals.org/content/clinmedicine>

BRIGGS, C. [et al.] (2012) - **Performance evaluation of the Sysmex haematology XN modular system**. Journal of Clinical Pathology. Vol. 65, nº11 (2012), p. 1024-1030. [Acedido a 15 de junho de 2022] Disponível em: <https://jcp.bmj.com/>

BUGNO, A. [et al.] (2015) - **Application of the BacT/ALERT 3D system for sterility testing of injectable products**. Brazilian Journal of Microbiology. Vol. 46, nº3 (2015) p. 743-747. [Acedido a 10 de junho de 2022]. Disponível na internet: <https://www.springer.com/journal/42770/>

BUTTARELLO, M. [et al.] (2004) - The New Reticulocyte Parameter (RET-Y) of the Sysmex XE 2100: Its Use in the Diagnosis and Monitoring of Posttreatment Sideropenic Anemia. American Journal of Clinical Pathology. Vol. 121, nº4 (2004), p. 489-495. [Acedido a 17 de junho de 2022]. Disponível na internet: <https://academic.oup.com/ajcp>

CATLIN, B. W. (1992). **Gardnerella vaginalis: characteristics, clinical considerations, and controversies**. Clinical Microbiology Reviews. Vol.5, nº3 (1992), p. 213-237. [Acedido a 26 de março de 2022]. Disponível na internet: <https://journals.asm.org/journal/cmr>

CIESLA, B. (2018) - **Hematology in Practice**. 2ª Ed. Philadelphia: FA Davis Company, 2018. Disponível em: https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=5td7DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP2&dq=hematology+is+an+area+where&ots=yBEUTN2zbo&sig=ADAp-_UCbfjuYwsQdhBhKgRL8Z4&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false. ISBNN: 978-0803668249.

DEBAST, S. B.; BAUER, M. P.; KUIJPER, E. J. (2014) -European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Update of the Treatment Guidance Document for Clostridium difficile Infection. Clinical Microbiology and Infection, Vol.20, nº2 (2014), p.1–26. [Acedido a 5 de março de 2022]. Disponível na internet: <https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/>

DELOUGHERY, T.G. (2019) -**Tests of Hemostasis and Thrombosis**. In: DELOUGHERY, T. G. Hemostasis and Thrombosis. Springer, Cham., 2019. ISBN: 978-3-030-19329-4. p. 11-18.

DEMIRAY, T. (2016) - **Prevalence of rotavirus and adenovirus in children with acute gastroenteritis**. Journal of Immunology and Clinical Microbiology. Vol.1, nº2 (2016), p.37-40 [Acedido a 1 de março de 2022]. Disponível em: <https://dergipark.org.tr/en/pub/jicm>

DIREÇÃO-GERAL DE SAÚDE. (1996) - **Resíduos Hospitalares**. Lisboa: DGS, 1996. [Acedido a 26 de junho de 2022]. Disponível na internet: https://iasaude.pt/UPS/legislacao/242_96.pdf.

DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE. (2011) -**Exames laboratoriais na Gravidez de Baixo Risco**. Lisboa: DGS, 2011. [Acedido a 09 de abril 2022]. 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. (2011) - **Prescrição e Determinação de Hemograma**. Lisboa: DGS, 2011. [Acedido a 19 de junho 2022]. Disponível na internet: https://ordemdosmedicos.pt/wp-content/uploads/2017/09/Prescricao_e_Determinacao_do_Hemograma.pdf

DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE (2017) - **Abordagem Diagnóstica e Terapêutica das Parasitoses em Idade Pediátrica**. Lisboa: DGS, 2017.[Acedido a 27 de fevereiro de 2022]. Disponível na internet: <https://normas.dgs.min-saude.pt/2017/06/12/abordagem-diagnostica-e-terapeutica-das-parasitoses-em-idade-pediatica/>

DIXON, L. R. (1997) - **The Complete Blood Count: Physiologic Basis and Clinical Usage**. The Journal of Perinatal & Neonatal Nursing. Vol. 11, nº3 (1997), p.1–18. [Acedido a 19 de junho de 2022]. Disponível na internet: <https://journals.lww.com/jpnnjournal/pages/default.aspx>

DRAKE, M. J. [et al.] (2017) - **The urinary microbiome and its contribution to lower urinary tract symptoms; ICI-RS 2015**. *Neurourology and Urodynamics*. Vol.36, n°4 (2017), p.850-853. [Acedido a 14 de fevereiro de 2022]. Disponível na internet: <https://onlinelibrary.wiley.com/journal/15206777>

EL AILA, N. A. [et al.]. (2010). Comparison of different sampling techniques and of different culture methods for detection of group B streptococcus carriage in pregnant women. *BMC Infections Diseases*. Vol.10, n°285 (2010), p.1-8. [Acedido a 4 de abril de 2022]. Disponível na internet: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-10-285#citeas>

FACKLAM, R. R. [et al.] (1979) - **Presumptive Identification of Group A, B, and D Streptococci on Agar Plate Media**. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol.9, n°6 (1979), p. 665-672. [Acedido a 23 de abril de 2022]. Disponível na internet: <https://journals.asm.org/journal/jcm>

FERRETTI, J. J.; STEVENS, D. L.; FISCHETTI, V. A. (2016). - **Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations**. Oklahoma: University of Oklahoma Health Sciences Center, 2016. [Acedido a 23 de abril de 2022]. Disponível na internet: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26866208/>

Fonseca, A. [et al.] (2004). - **Orientações para a elaboração de um Manual de Boas Práticas em Bacteriologia**. Lisboa: Programa Nacional de Controlo da Infecção (PNCI) – Instituto Nacional de Saúde, Dr. Ricardo Jorge, Observatório Nacional de Saúde (ONSA), 2004. [Acedido a: 26 de fevereiro de 2022]. 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>

FORD, J. (2013) - **Red blood cell morphology**. *International journal of laboratory hematology*. Vol.35, n°3 (2013), p. 351-357. [Acedido a 19 de junho de 2022]. Disponível na internet: <https://onlinelibrary.wiley.com/journal/1751553x>

FOURNIER, P.E. [et al.] (2013) - **Modern clinical microbiology: new challenges and solutions**. *Nature Reviews Microbiology*. Vol. 11, n°8 (2013), p.574-585. [15 de Janeiro de 2022]. Disponível na internet: <https://www.nature.com/nrmicro/>

GEORGE-GAY, G.; PARKER, K. (2003) - **Understanding the complete blood count with differential**. Journal of PeriAnesthesia Nursing. Vol.18, nº2 (2003), p.96-117. [Acedido a 15 de junho de 2022]. Disponível na internet: <https://www.sciencedirect.com/journal/journal-of-perianesthesia-nursing/vol/18/issue/2>

GILBERT, N. M. [et al.] (2019) - **Gardnerella vaginalis and Prevotella bivia Trigger Distinct and Overlapping Phenotypes in a Mouse Model of Bacterial Vaginosis**. The Journal of Infectious Diseases. Vol. 220, nº7 (2019), p. 1099-1108. [Acedido a 26 de março de 2022]. Disponível na internet: <https://academic.oup.com/jid>

GODDARD, A. F. [et al.] (2011). **Guidelines for the management of iron deficiency anaemia**. Gut. Vol.60, nº10 (2011), p.1309–1316. [Acedido a 6 de junho de 2022]. Disponível na internet: <https://gut.bmj.com/>

GRABE, M. [et al.] (2015) - **Guidelines on Urological Infections**. Netherlands: European Association of Urology, 2015 [Acedido a 14 de fevereiro de 2022]. Disponível na Internet: https://uroweb.org/wp-content/uploads/19-Urological-infections_LR2.pdf

GUPTA V. (2014) - **Assessment of red blood cell parameters and peripheral smear at different temperatures in case of cold agglutination disease**. Annals of medical and health sciences research. Vol. 4, nº1 (2014), p.25–28. [Acedido a 20 de junho de 2022]. Disponível na internet: <https://www.amhsr.org/>

HAMER, D. H.; GILL, C. J.; CHILENGI, R. (2017) - **Intestinal Infections: Overview**. In: QUAH, S., R; COCKERHAM, W. International Encyclopedia of Public Health. Massachusetts: Academic Press, 2017. ISBN:9780128037089, p. 322-335.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. (2016) - **Essential haematology**. 7ª Ed. EUA: Wiley-Blackwell, 2016. ISBN: 978-1-118-40867-4.

HUH, J.; MOON, H.; CHUNG, W. (2007) - **Erroneously elevated immature reticulocyte counts in leukemic patients determined using a Sysmex XE-2100 hematology analyzer**. Annals of Hematology. Vol. 86 (2007), p.759–762. [Acedido a 21 de junho de 2022]. Disponível na internet: https://www.springer.com/journal/277?gclid=Cj0KCQjwn4qWBhCvARIsAFNAMih5GNACer7ek_14wKUJDD8268AAHPqqtPZpinjocT8uBhTAJz4ugaAu0IEALw_wcB

JAIN, N.; LODHA, R.; KABRA, S.K. (2001) - **Upper respiratory tract infections**. The Indian Journal of Pediatrics. Vol. 68 (2001), p.1135–1138. [Acedido a 10 de abril de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.ijppediatricsindia.in/>

JOHNSON, C.B.; ZHANG, J.; LUCAS, D. (2020) - **The Role of the Bone Marrow Microenvironment in the Response to Infection**. Frontiers in Immunology. Vol. 11 (2020). [Acedido a 15 de junho de 2022]. Disponível na internet: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology>

JORGENSEN, J. H.; FERRARO, M. J. (2009) - **Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices**. Clinical Infectious Diseases, Vol. 49, nº11 (2009), p.1749–1755. [Acedido a 11 de junho de 2022]. Disponível na internet: <https://academic.oup.com/cid>

KEOHANE, E.; SMITH, L.; WALENGA, J. (2016) - **Rodak's Hematology Clinical Principles and Applications**. 5ª Ed. Canada: Elsevier, 2016. ISBN: 978-0-323-23906-6

KIM, H. [et al.] (2012) - **Ethylenediaminetetraacetic acid-dependent pseudothrombocytopenia associated with neuroendocrine carcinoma: A case report**. Oncology Letters, Vol. 4, nº1 (2012), p.86-88. [Acedido a 21 de junho de 2022]. Disponível na internet: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2012.675>

KO, C.W. [et al.] (2020) - **AGA Clinical practice guidelines on the gastrointestinal evaluation of iron deficiency anemia**. Gastroenterology. Vol.159, nº3 (2020), p.1085-1094 [Acedido a 7 de junho de 2022]. Disponível na internet: <https://www.gastrojournal.org/>

KUMAR, V.; GILL, K.D. (2018) - **Quality Control in Laboratory**. In: KUMAR, V.; GILL, K.D. Basic Concepts in Clinical Biochemistry: A Practical Guide. Singapura: Springer Singapore, 2018. ISBN: 978-981-10-8186-6. p. 9–12.

LEBER, A.L. (2016). **Clinical microbiology procedures handbook**. 4ª Ed. Washington, DC: ASM Press, 2016. ISBN: 9781683670766.

LIN, K-W.; CHANG, Y-C. (2021) - **Embedded Immunodetection System for Fecal Occult Blood**. Biosensors. Vol.11, nº4 (2021), p. 1-10 [Acedido a 1 de março de 2022.]

MAENHOUT, T. M.; MARCELIS, L. (2014) - **Immature granulocyte count in peripheral blood by the Sysmex haematology XN series compared to microscopic**

differentiation. Journal of Clinical Pathology. Vol.67, nº7 (2014), p.648–650. <https://jcp.bmj.com/>

MAHON, C.; LEHMAN, D. (2019). **Textbook of Diagnostic Microbiology.** 5ª Ed. Missouri: Elsevier Sander, 2019. ISBN: 978-0-323-48218-9

MARCUCCI, C. E.; SCHOETTKER, P. (2015). **Perioperative Hemostasis: Coagulation for Anesthesiologists.** Switzerland: Springer, 2015. ISBN: 978-3642550034.

MAWAK, J. [et al.] (2011). **Prevalence of genital *Chlamydia trachomatis* infection among gynaecologic clinic attendees.** Shiraz E-Medical Journal. Vol.12, nº2 (2011), p.100-106. [Acedido a 26 de março de 2022]. Disponível na internet: <https://brieflands.com/journals/shiraz-e-medical-journal/>

MEKLIN, J., SYRJÄNEN, K.; ESKELINEN, M. (2020). Colorectal Cancer Screening With Traditional and New-generation Fecal Immunochemical Tests: A Critical Review of Fecal Occult Blood Tests. Anticancer Research. Vol. 40, nº2 (2020), p. 575–581. [Acedido a 1 de março de 2022]. Disponível na internet: <https://ar.iiarjournals.org/>

MILHEIRIÇO, C.; DE LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. (2017) - Full-Genome Sequencing Identifies in the Genetic Background Several Determinants That Modulate the Resistance Phenotype in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Carrying the Novel *mecC* Gene. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 61, nº3 (2017), p.1-9. [Acedido a 15 de abril de 2022]. Disponível na internet: <https://journals.asm.org/journal/aac>

MILLER, G. [et al.] (2002) - **Data warehousing and information management strategies in the clinical immunology laboratory.** Clinical and Applied Immunology Reviews. Vol.3, nº1-2 (2002), p73–86. [Acedido a 14 de junho de 2022]. Disponível na internet: <https://www.journals.elsevier.com/clinical-and-applied-immunology-reviews>

MOREIRA, M. [et al.] (2013) - **Prevenção da doença neonatal precoce por *Streptococcus do grupo B* no século XXI: do passado ao futuro.** Acta Obstétrica e Ginecológica Portuguesa. Vol. 7, nº3 (2013), p.180-189. [Acedido a 23 de abril de 2022]. Disponível na Internet: <http://www.fspog.com/pt/acta-obstetrica-e-ginecologica-portuguesa/>

MOTA, C. L. DA, & BEÇA, H. P. (2013) - **Análise sumária de urina de rotina: porquê e para quê?** Revista Portuguesa De Medicina Geral E Familiar, Vol.29, nº4 (2013), p.244-248.

[Acedido a 14 de fevereiro de 2022]. Disponível na internet: <https://www.rpmgf.pt/ojs/index.php/rpmgf/article/view/11109>

MURDOCH, D. R. [et al.] (2001) - Evaluation of a rapid immunochromatographic test for detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen in urine samples from adults with community-acquired pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol.39, nº10 (2001), p.3495–3498. [Acedido a 19 de fevereiro de 2022]. Disponível na internet: <https://journals.asm.org/journal/jcm>

Muñoz, P. [et al.] (1992) - **The CLED agar option in urine culture routine**. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. Vol.15, nº4 (1992), p.287–290. [Acedido a 17 de fevereiro de 2022]. Disponível na internet: <https://www.sciencedirect.com/journal/diagnostic-microbiology-and-infectious-disease>

MURRAY, P.R., ROSENTHAL, K.S., PFALLER, M.A. (2016). **Medical Microbiology**, 8ª Ed. Philadelphia: Elsevier, ISBN 978-0-323-29956-5

NEEMANN, K.; FREIFELD, A. (2017) - ***Clostridium difficile*–Associated Diarrhea in the Oncology Patient**. *Journal of Oncology Practice*. Vol.13, nº1 (2017), p.25–30. [Acedido a 5 de março de 2022]. Disponível na internet: <https://ascopubs.org/journal/op>

NESTER, E.; ANDERSON, D.; ROBERTS, C. E. (2011). - **Microbiology: A Human Perspective**. 7ªEd. New York: McGraw-Hill Education. ISBN 978-0073375311

Norma nº 30/2013/DGS. 2013, Abordagem, Diagnóstico e Tratamento - **Abordagem, Diagnóstico e Tratamento da Ferropenia no Adulto**. Lisboa: DGS. 37 p.

OSHIRO, I.; TAKENAKA, T; MAEDA, J. (1982) - **New method for hemoglobin determination by using sodium lauryl sulfate (SLS)**. *Clinical Biochemistry*. Vol.15, nº2 (1982), p.83–88. [Acedido a 15 de junho de 2022]. Disponível em: <https://www.journals.elsevier.com/clinical-biochemistry>

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (2019) - **The top 10 causes of death**. [Acedido a 24 de abril de 2022]. Disponível na internet: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.

PATEL, D. A. [et al.] (2003) - **Reproductive tract infections**. USA: National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion. Division of Reproductive Health, 2003.

[Acedido a 19 de março de 2022]. Disponível na Internet: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/11673>

PAUL, P. [et al.] (2013) - **Co-existent Platelet Phagocytosis, Satellitism and Clumping Causing Spurious Thrombocytopenia**. Indian Journal of hematology and Blood Transfusion. Vol. 29, nº3 (2013), p.158–160. [Acedido a 21 de junho de 2022]. Disponível na internet: <https://link.springer.com/journal/12288/volumes-and-issues>

PEREZ-PEREZ G.I.; BLASER, M.J. (1996) - **Campylobacter and Helicobacter**. In: BARON S. Medical Microbiology. Texas: University of Texas Medical Branch at Galveston, ISBN: , 978-0963117212. Capítulo 23.

PICHUTTI, G. A.; DE AVÓ, L. R. DA S. .; GERMANO, C. M. (2021) - **Automação em urinálise e microbiologia: determinação de valores de corte para detecção de infecção de trato urinário**. Latin American Journal of Development. Vol. 3, nº2 (2021), p. 753–766. [Acedido a 14 de fevereiro de 2022]. Disponível na Internet: <https://latinamericanpublicacoes.com.br/ojs/index.php/jdev/article/view/262>.

PIERI, M. [et al.] (2021). Evaluation of the Diesse Cube 30 touch erythrocyte sedimentation method in comparison with Alifax test I and the manual Westergren gold standard method. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Vol.81, nº3 (2021), p. 181–186. [Acedido a 22 de junho de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.scijournal.org/impact-factor-of-scand-j-clin-lab-inv.shtml>

PINCUS, D. H. (2006) - **Microbial identification using the bioMérieux Vitek® 2 system**. In: Miller, M. J. Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods. Maryland: Parenteral Drug Association, 2006. p.1-32

PUBLIC HEALTH ENGLAND. (2018). **Staining procedures**. UK: Standards for Microbiology Investigations. [Acedido a 26 de junho de 2022]. Disponível na internet: <https://www.gov.uk/government/collections/standards-for-microbiology-investigations-smi>

RAAFAT, R.; DWEDAR, R.A.; & EL-SEIDI, E.A. (2015). **Evaluation of the Chromogenic Medium (CPS) in the Isolation and Identification of Urinary Tract Pathogens**. Egyptian Journal of Medical Microbiology Vol. 24 (2015), p.29-34. [Acedido a 18 de fevereiro de 2022]. Disponível na internet: <https://ejmm.journals.ekb.eg/>

REINER, K. (2010). **Catalase test protocol**. American Society for Microbiology, p.1-6 (2010). [Acedido a 26 de junho de 2022]. Disponível na internet: <https://asm.org/>

RIEDEL, S.; CARROLL, K. C. (2010). **Blood cultures: key elements for best practices and future directions**. Journal of Infection and Chemotherapy. Vol.16, nº5 (2010), p.301–316. [Acedido a 10 de junho de 2022]. Disponível na internet: <https://www.jiac-j.com/>

Silva, T. L. [et al.]. (2004) - **Citometria de fluxo: funcionalidade celular on-line em bioprocessos**. Boletim de Biotecnologia. Vol. 77 (2004), p. 32-40 [Acedido a 15 de junho de 2022]. Disponível na internet: <https://www.spbt.pt/>

SHIELDS, P.; CATHCART, L. (2010) - **Oxidase test protocol**. American Society for Microbiology, p. 1-9. (2010). [Acedido a 26 de junho de 2022]. Disponível na internet: <https://asm.org/>

TEBO, A. E. [et al.] (2014). - **Clinical Laboratory Immunology: An Indispensable Player in Laboratory Medicine**. American Journal of Clinical Pathology. Vol. 142, nº4 (2014), p.437–444. [Acedido a 14 de junho de 2022]. Disponível na internet: <https://academic.oup.com/ajcp>

TURNER, N. A. [et al.] (2019) - **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research**. Nature Reviews Microbiology. Vol. 17 (2019), p. 203-218. [Acedido a 15 de abril de 2022]. Disponível na internet: <https://www.nature.com/nrmicro/>

UCHIHASHI, K. [et al.] (2015) - **XN-L Series**. Sysmex Journal International. Vol. 25, nº1. [Acedido a 15 de junho de 2022]. Disponível na internet: https://www.sysmex.co.jp/en/products_solutions/library/journal/index.html

UNEMO, M. [et al.] (2019) - **Gonorrhoea**. Nature Reviews Disease Primers. Vol.5, nº1 (2019). [Acedido a 20 de março de 2022]. Disponível na internet: <https://www.nature.com/nrdp/>

VASANTHAKUMARI, R.; JAGANNATH, K.; RAJASEKARAN, S.(1986) - **A cold staining method for acid-fast bacilli**. Bulletin of the World Health Organization. Vol.64, nº5 (1986), p. 741–743. [Acedido a 9 de junho de 2022]. Disponível na internet: <https://www.who.int/publications/journals/bulletin>

VILA, J. [et al.] (2009) - **Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales**. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Vol. 27, nº7 (2009), p.406–411. [Acedido a 26 de fevereiro de 2022]. Disponível na internet: <https://www.sciencedirect.com/journal/enfermedades-infecciosas-y-microbiologia-clinica>

WONG, L. W. [et al.] (2020). - Human Intestinal Parasitic Infection: A Narrative Review on Global Prevalence and Epidemiological Insights on Preventive, Therapeutic and Diagnostic Strategies for Future Perspectives. Expert Review of Gastroenterology & Hepatology. Vol. 14, nº 11 (2020), p. 1093-1105. [Acedido a 27 de fevereiro de 2022]. Disponível na internet: <https://www.tandfonline.com/journals/ierh20>

WONG, Y. P. (2018) - **Gardnerella vaginalis in perinatology: An overview of the clinicopathological correlation**. The Malaysian journal of pathology. Vol. 40, nº3 (2018), p. 267-286 [Acedido a 26 de março de 2022]. Disponível na internet: <http://www.mjpath.org.my/>

ZAIDI, A.; GREEN, L. (2019). **Physiology of haemostasis**. Anaesthesia & Intensive Care Medicine. Vol. 20, nº3 (2019), p. 152-158. [Acedido a 23 de junho de 2022]. Disponível na internet: <https://www.anaesthesiajournal.co.uk/>

ZAMAN, Z. [et al.](2001) - **Evaluation of Aution Max AX-4280 Automated Urine Test-Strip Analyser**. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Vol.39, nº7 (2001), p. 649-657. [Acedido a 13 de junho de 2022]. Disponível na internet: <https://www.degruyter.com/journal/key/cclm/html>

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

XVI. ANEXOS

A. ANEXO I - Coloração de Gram

Tabela 6 - Reagentes da coloração de Gram.

Reagentes	Tempo (minutos)
Cristal Violeta	1
Solução de Lugol	1
Álcool-acetona (Diferenciador)	1
Safranina (contra-coloração)	1

PROCEDIMENTO (Fonseca, *et al.*, 2004):

1. Executar o espalhamento da porção do produto biológico ou de uma colónia proveniente do meio de cultura, com pequenos movimentos circulares até o seu esgotamento. No caso de uma colónia proveniente do meio de cultura adicionar previamente na lâmina uma gota de soro;
2. Após secagem, fixação e arrefecimento, cobrir a lâmina com a solução de cristal violeta, durante 1 minuto;
3. Lavar suavemente com água corrente;
4. Cobrir a lâmina com lugol e deixar atuar durante 1 minuto;
5. Lavar com água corrente;
6. Descorar com álcool-acetona;
7. Lavar com água corrente;
8. Cobrir a lâmina com safranina, durante 1 minuto;
9. Lavar com água corrente, escorrer e limpar o excesso de água;
10. Deixar a lâmina secar à temperatura ambiente;
11. Observar com objetiva de x100 em óleo de imersão, com diafragma aberto e condensador em cima.

B. ANEXO II - Coloração de Kinyoun

Tabela 7 - Reagentes da coloração de Kinyoun.

Reagentes	Tempo (minutos)
Carbolfucsina de Kinyoun	5
Ácido sulfúrico e álcool etílico (agente descolorante)	3
Azul de metileno (contra-coloração)	1

PROCEDIMENTO (Public Health England, 2018):

1. Executar o espalhamento da porção do produto biológico ou de uma colónia proveniente do meio de cultura, com pequenos movimentos circulares até o seu esgotamento. No caso de uma colónia proveniente do meio de cultura adicionar previamente na lâmina uma gota de soro;
2. Após a realização e fixação do esfregaço, deixar a lâmina arrefecer;
3. Cobrir a lâmina com a solução de Carbolfucsina, durante 5 minutos;
4. Lavar gentil e abundantemente a preparação com água;
5. Cobrir a lâmina com a solução de ácido-álcool, durante 3 minutos;
6. Lavar abundantemente com água;
7. Aplicar a solução de azul de metileno, durante 1 minuto;
8. Lavar a preparação com água;
9. Deixar secar à temperatura ambiente;
10. Observar com objetiva de x100 em óleo de imersão, com diafragma aberto e condensador em cima.

C. ANEXO III - Meios de cultura utilizados no LACSM

Tabela 8 - Meios de cultura, utilizados no LACSM, da *bioMérieux* (*bioMérieux*, Marcy-l'Etoile, França) e respetivas características gerais (Fonseca, *et al.*, 2004; Zimbro, *et al.*, 2009).

MEIOS DE CULTURA	CARATERÍSTICAS
MEIOS SÓLIDOS	
Gelose de sangue (COS – <i>Columbia agar</i> + 5% <i>sheep blood</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Meio não seletivo; • Meio nutritivo e muito rico; • A suplementação em 5 % de sangue de carneiro: <ul style="list-style-type: none"> - Fornece fatores de crescimento adicionais ao crescimento para microrganismos fastidiosos; - Permite determinar a reação hemolítica (α ou β) devido à presença do fator X (Hemina).
Gelose de chocolate (PVX – <i>Chocolate agar</i> + <i>PolyVitex™</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Meio não seletivo; • Permite o isolamento de bactérias exigentes, como <i>Neisseria</i> spp., <i>Haemophilus</i> spp. e <i>Streptococcus pneumoniae</i>; • Meio composto por uma base nutritiva enriquecida com o fator X (Hemina), proveniente da hemoglobina, e com o fator V (nicotinamida adenina, NAD), fornecida pelo <i>PolyVitex™</i>.
Gelose MacConkey (MCK) – <i>Mac Conkey Agar</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Meio seletivo e diferencial; • Permite o isolamento de enterobactérias e outras bactérias de Gram-negativo; • Na sua constituição possui cristal violeta e sais biliares que inibem o crescimento da maioria das bactérias de Gram-positivo; • Permite distinguir microrganismos fermentadores da lactose e não fermentadores da lactose, através da alteração da cor: <ul style="list-style-type: none"> - Fermentadores da lactose: Colónias cor-de-rosa a vermelho; - Não fermentadores da lactose: incoloros ou ligeiramente beges.
Gelose de Chapman (MSA2 – <i>Mannitol Salt 2 Agar</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Meio seletivo; • Permite o isolamento de <i>Staphylococcus</i> spp.; • Permite a identificação presuntiva de <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>); • A fermentação do manitol permite o diagnóstico presuntivo de <i>S. aureus</i>. Estas fermentam o manitol e as colónias apresentam uma cor amarela e descoloração amarela à volta da colónia; • A presença de um elevado teor de cloreto de sódio no meio inibe o desenvolvimento da maior parte das bactérias de Gram-negativo.

Tabela 8 (Continuação) - Meios de cultura, utilizados no LACSM, da *bioMérieux* (*bioMérieux*, Marcy-l’Etoile, França) e respetivas características gerais (Fonseca, et al., 2004; Zimbro, et al., 2009).

<p>Gelose Chromid® MRSA Smart (MRSM - <i>Chromid®</i> MRSA smart Agar)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Meio cromogénico • Meio destinado ao rastreio de estirpes de <i>S.aureus</i> resistentes à metilina (MRSA); • A constituição do meio é rica em nutrientes, e contém substratos cromogéneos e uma combinação de antibióticos que favorece o crescimento de MRSA; • As colónias de MRSA apresentam-se com uma coloração rosa a vermelho.
<p>Gelose Salmonella-Shigella (SS – SS Agar)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Meio seletivo e diferencial; • Permite o isolamento de <i>Salmonella</i> spp. e <i>Shigella</i> spp.; • Permite detetar colónias fermentadoras da lactose: <ul style="list-style-type: none"> - Fermentadoras: colónias cor-de-rosa; -Não fermentadoras: incolores; • Permite detetar colónias redutoras de tiosulfato de sódio (produção de sulfureto de hidrogénio, H₂S). Estes microrganismos formam colónias com um centro preto; • Colónias típicas de <i>Salmonella</i> spp.: incolores, com ou sem centro preto; • Colónias típicas de <i>Shigella</i> spp.: incolores, sem centro preto.
<p>Gelose Campyloset (CAM – <i>Campyloset</i> Agar)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Meio seletivo; • Permite o isolamento de <i>Campylobacter</i> spp. (<i>Campylobacter jejuni</i> (<i>C. jejuni</i>) e <i>Campylobacter coli</i> (<i>C. coli</i>)), a partir de fezes; • O meio é constituído por sangue de carneiro que favorece o crescimento destas bactérias, e é constituído por agentes antibióticos e antifúngicos que inibem o crescimento de bactérias da flora e de fungos, respetivamente; • Este meio deve ser incubado em atmosfera microaerofílica;
<p>Gelose Granada (GRAN – <i>Granada</i> Agar)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Meio seletivo para o rastreio e identificação de <i>Streptococcus agalactiae</i> (<i>S. agalactiae</i>); • Meio constituído por uma mistura de antibióticos para inibir bactérias de Gram-negativo e leveduras; • Os constituintes deste meio permitem o crescimento de colónias com uma cor-de-laranja, característico de colónias de <i>S. agalactiae</i>.

Tabela 8 (Continuação) - Meios de cultura, utilizados no LACSM, da *bioMérieux* (*bioMérieux*, Marcy-l'Etoile, França) e respectivas características gerais (Fonseca, *et al.*, 2004; Zimbro, *et al.*, 2009).

<p>Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol (SGC2 – <i>Sabouraud Gentamicin</i> <i>Choramphenicol 2 Agar</i>)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Meio seletivo para o isolamento de fungos; • O meio possui na sua constituição gentamicina e cloranfenicol para inibir o crescimento da maioria das bactérias de Gram-negativo e de Gram-positivo; • O pH ligeiramente ácido favorece o crescimento fúngico e inibe o crescimento de bactérias.
<p>Cistina-Lactose-Deficiente em Eletrólitos (CLED)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Meio não seletivo e diferencial; • Permite o isolamento e quantificação dos principais agentes etiológicos das infecções do trato urinário; • A deficiência em eletrólitos restringe o <i>swarming</i> de <i>Proteus</i> spp.; • A presença de lactose permite diferenciar fermentadores de não fermentadores: <ul style="list-style-type: none"> -Fermentadores: colónias amarelas; -Não fermentadores: colónias azuis, verdes ou incolores;
<p>ChromID™ CPS® Elite (CPSE)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Meio cromogénico; • A constituição nutritiva do meio, em combinação com diferentes peptonas e substratos cromogéneos, permite a identificação presuntiva dos principais agentes etiológicos das infecções do trato urinário; • A elevada concentração de agar previne o <i>swarming</i> de <i>Proteus</i> spp.
MEIOS LÍQUIDOS	
<p>Caldo Coração – cérebro (BHI-T – <i>Brain-Heart Infusion Broth</i>)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Meio líquido com uma base nutritiva enriquecida; • Este caldo permite o crescimento de microrganismos aeróbios exigentes;
<p>Caldo Selenito F (SELENITE F-T - <i>Selenite F broth</i>)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Meio líquido de enriquecimento para <i>Salmonella</i> spp.; • O selenito de sódio inibe a maioria das <i>Enterobacteriaceae</i>, inclusive algumas estirpes de <i>Shigella</i> spp.

D. ANEXO IV - Cartas utilizadas no equipamento VITEK®2 COMPACT

Tabela 9 - Cartas utilizadas no equipamento VITEK®2 COMPACT e a sua finalidade,

CARTAS	DENSIDADE McFARLAND	FINALIDADE
VITEK® 2 GP	0,50 – 0,63	Identificação de bactérias de Gram-positivo.
VITEK® 2 AST- P586	0,50 – 0,63	TSA para <i>Streptococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp..
VITEK® 2 AST – P648	0,50 – 0,63	TSA para <i>Staphylococcus</i> spp..
VITEK® 2 GN	0,50 – 0,63	Identificação de bactérias de Gram-negativo.
VITEK® 2 AST – N355	0,50 – 0,63	TSA para bacilos de Gram-negativo (uso hospitalar).
VITEK® 2 ASR – N359	0,50 – 0,63	TSA para bacilos de Gram-negativo (uso ambulatorio).
VITEK® 2 – N373	0,50 – 0,63	TSA para bacilos de Gram-negativos não fermentadores.
VITEK® 2 ST03	0,50 – 0,63	Identificação de <i>Streptococcus pneumoniae</i> (<i>S.pneumoniae</i>), <i>Streptococcus</i> beta-hemolíticos e <i>Streptococcus</i> do grupo viridans.
VITEK® 2 NH	2.,0 – 3,30	Identificação de <i>Neisseria</i> spp. e <i>Haemophilus</i> spp.
VITEK® 2 YST	1,80 – 2,20	Identificação de leveduras.

TSA - Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

E. ANEXO V - Equipamentos utilizados na Bioquímica

Tabela 10 - Equipamentos utilizados na Bioquímica, e respetiva metodologia e parâmetros avaliados.

Equipamento	Metodologia	Parâmetro
Siemens Advia® 1800 Clinical Chemistry (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Nova Iorque, EUA)	Colorimetria Imunoturbidimetria	Ácido úrico, alanina aminotransaminase (ALT), Albumina, Amilase, anti-estreptolisina O, α 1-antitripsina, Aspartato aminotransaminase (AST), bilirrubina direta, bilirrubina total, β 2-microglobina, Capacidade total de ligação do ferro (TIBC), Colesterol total, Colesterol-HDL, colesterol-LDL, Cálcio, Creatinina, Creatinina quinase, C3, C4, Fator Reumatóide, Ferro, Fosfatase Alcalina, Fósforo Inorgânico, γ -glutamyl-transferase, glucose, Lactato desidrogenase (LDH), Lipase, Magnésio, Microalbumina, Proteína C reativa (PCR), Proteínas totais Ureia
	Potenciometria	Cloreto (Cl ⁻), Potássio (K ⁺) e Sódio (Na ⁺).
CAPPILARYS 2 (Sebia, Lisses, França)	Eletroforese capilar	<u>Proteínas Séricas</u> : Albumina, α -1-globulina, α -2-globulina, β -1-globulina β -2-globulina, γ -globulina <u>Sangue total</u> : Hemoglobina A, Hemoglobina A ₂ , Hemoglobina F.
Aution-Max AX-4280 (Arkay USA Clinical Diagnostics, Minnesota, EUA)	Espetofotometria de refletância	Densidade, cor, turvação, pH, glucose, corpos cetónicos, urobilinogénio, nitritos, hemoglobina, bilirrubina, esterase leucocitária e proteínas.
Spotlyte (Menarini diagnostics S.r.l., Florence, Itália)	Potenciometria	Lítio

F. ANEXO VI - Equipamentos utilizados na Imunologia

Tabela II - Equipamentos utilizados na Imunologia, e respetiva metodologia e parâmetros avaliados.

Equipamento	Métodos	Parâmetros
ADVIA Centaur®XP Imunoassay System (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Nova Iorque, EUA)	Quimioluminiscência	Imunoensaio em Sandwich Gonadotrofina coriônica humana (β-hCG), Peptido Natriuretico do tipo B (BNP), CK-MB massa, Hormono folículo-estimulante (FSH), Anticorpo Anti VHA IgM (Hepatite A), Anticorpo Anti VHA IgG (Hepatite A), Imunoglobulina E (IgE), Hormona Luteínica (LH), Prolactina (PRL), PRL 2ª determinação, PRL 3ª determinação, Hormona paratiroideia (PTH), <i>Veneral research disease laboratory (VDRL)</i> com titulação.
		Imunoensaio Competitivo Estradiol (2ª determinação), Estradiol (E2), Prolactina (PRL), PRL 2ª determinação, PRL 3ª determinação, Hormona paratiroideia (PTH)
ADVIA Centaur®XPT Imunoassay System (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Nova Iorque, EUA)	Quimioluminiscência	Imunoensaio em Sandwich Alfa-fetoproteína (AFP), Gonadotrofina coriônica humana (β-hCG), Peptido Natriuretico (BNP), CA 125 (Antigénio carboidrato), CA 15.3 , CA 19.9 , Antigénio Carcinembrionario (CEA), CEA Líquido Orgânico, CK-MB massa, Anticorpo HBc (Hepatite B), Anticorpo HBs (Hepatite B), Antigénio HBe (Hepatite B), Antigénio HBs (Hepatite B), Anticorpo VHC (vírus da Hepatite C), Antigénio p24+ Anticorpo HIV1/2 (Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), Porção N-terminal do Peptido Natriuretico do tipo B (NT-ProBNP), Antigénio Específico da Prostata (PSA), PSA livre,

Tabela II (Continuação) - Equipamentos utilizados na Imunologia, e respetiva metodologia e parâmetros avaliados.

		Imunoensaio Competitivo	Anticorpo Anti-Tiroideus (Tg, TPO), Folato , Triiodotironina livre (FT3), Tiroxina livre (FT4), Hormona tiroestimulante (TSH), Triiodotironina total (T3), Tiroxina total (T4), Vitamina B12 (Cianocobalamina).
VIDAS (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, França)	Fluoroenzimático	Imunoensaio em <i>Sandwich</i>	Progesterona , IgG do Citomegalovírus (CMV), IgM do CMV, IgG da Rubéola , IgM da Rubéola

G. ANEXO VII - Técnicas manuais da Serologia

Tabela 12 - Técnicas manuais na serologia.

Teste	Kit	Finalidade
VRDL	SYPHILIS RPRP-TESTE (<i>Mascia brunelli S.p.A.</i> , Milão, Itália)	Screening de Sífilis (Agente Etiológico: <i>Treponema pallidum</i>)
Widal	Micropath® Antígenos/Febrile (<i>OMEGA DIAGNOSTICS, LTD.</i> , Escócia, Reino Unido)	Deteção de anticorpos anti- <i>Salmonella</i> .
Rose Bengal	BRUCELLA BENGAL ROSE SLIDE TEST (<i>Mascia brunelli S.p.A.</i> , Milão, Itália)	Screening de Brucelose.
Paul Bunnel	MONONUCLEOSI LATEX (<i>Mascia brunelli S.p.A.</i> , Milão, Itália)	Screening de Mononucleose Infeciosa (Agente Etiológico: Vírus <i>Epstein-Barr</i>)
Waler-Rose	Avitex® Rose Waler (<i>Mascia brunelli S.p.a.</i> , Milão, Itália)	Deteção do Fator Reumatóide.
Malária	Bioline™ MALARIA Ag P.fIP.v (<i>Abbott Diagnostics Korea Inc.</i> , Yongin, Gyeonggi-Do, Coreia do Sul)	Deteção de antígenos de <i>Plasmodium falciparum</i> e de <i>Plasmodium vivax</i> .
Dengue	SD BIOLINE DENGUE DUO (<i>Standard Diagnostics, In.</i> , (SD), Suwon-Si, Coreia do Sul)	Screening do vírus da dengue

H. ANEXO VIII - Índices Eritrocitários

Tabela 13 - índices eritrocitários e respetivo cálculo e significado clínico (Gay-George & Parker, 2003; Keohane, Smith & Walenga, 2016).

Parâmetro	Cálculo	Significado clínico
VGM (Volume Globular Médio)	$\frac{HCT \times 10}{RBC}$	<ul style="list-style-type: none"> Representa o volume ou o tamanho médio de cada eritrócito; É expresso em fentolitros (fL); O intervalo de referência é entre 80 e 100 fL; O VGM classifica as anemias como microcíticas (VGM < 80 fL), normocíticas (VGM entre 80 e 100 fL) e macrocíticas (VGM > 100 fL).
HGM (Hemoglobina Globular Médio)	$\frac{Hg \times 10}{RBC}$	<ul style="list-style-type: none"> Representa o conteúdo médio de hemoglobina no eritrócito; É expresso em picograma (pg); O intervalo de referência é por volta de 26-34 pg; O HGM tipicamente não é considerado na classificação de anemias; Alterações nos valores de HGM tendem a acompanhar as alterações nos valores de VGM.
CHGM (Concentração de Hemoglobina Globular Média)	$\frac{Hg \times 100}{RBC}$	<ul style="list-style-type: none"> Representa a concentração média de hemoglobina em cada eritrócito; É expresso em g/dL; O intervalo de referência é por volta de 32-36 g/dL; Classifica as anemias em hipocrómicas (CHGM < 32 g/dL), normocrómicas (CHGM entre 32 e 36 g/dL) e hiperocrómicas (CHGM > 36 g/dL); Valores entre 36 e 38 g/dL devem ser investigados para a presença de esferócitos; Um valor superior a 38 g/dL deve ser investigado para um erro no valor de hemoglobina. Outra possível causa para um valor marcadamente elevado de CHGM pode dever-se à presença de aglutinação a frio, pelo que a amostra deve ser incubada a 37°C, durante 15 minutos, antes de realizar nova análise.
RDW - Red Cell Distribution (Distribuição do Diâmetro dos Eritrócitos)	RDW-SD (fL) RDW-CV (%)	<ul style="list-style-type: none"> O RDW dá indicação da variação do tamanho dos eritrócitos; É um índice de anisocitose, que designa a heterogeneidade do tamanho celular dos eritrócitos; O RDW é útil no diagnóstico diferencial entre anemias.

SD - Standard deviation (Desvio-padrão); **CV**-Coefficient of variation

I. ANEXO IX - Características e funções gerais dos diferentes leucócitos

Tabela 14 - Características e funções gerais dos diferentes leucócitos (Gay-George & Parker, 2003; Hoffbrand & Moss, 2016; Keohane, Smith & Walenga, 2016).

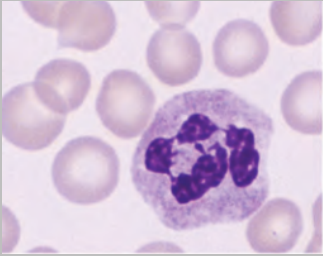
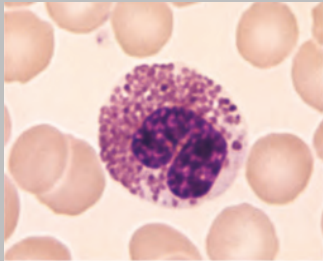
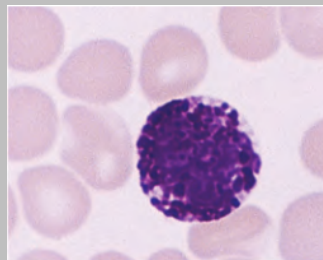
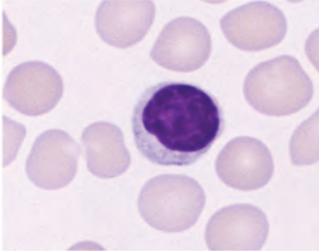

Leucócito	Caraterísticas e Funções
<p>Neutrófilo</p>  <p>(Hoffbrand & Moss, 2016)</p>	<ul style="list-style-type: none">• Representam 50 a 70% dos leucócitos no sangue periférico;• Também são designados de neutrófilos segmentados ou neutrófilos polimorfonucleares (PMN);• O núcleo é segmentado, possuindo entre 2 a 5 lobos;• Quando corado, a cor do citoplasma é rosa avermelhado, devido à presença de granulação fina;• Fazem parte do sistema imunológico inato;• A sua principal função é a fagocitose e destruição de substâncias estranhas e de microrganismos.
<p>Eosinófilo</p>  <p>(Hoffbrand & Moss, 2016)</p>	<ul style="list-style-type: none">• Representam entre 0 a 5% dos leucócitos no sangue periférico;• O núcleo é segmentado, possuindo entre 2 a 3 lobos;• Quando corados, os seus grânulos citoplasmáticos coram de laranja claro a escuro;• Possui múltiplas funções, destacando-se o importante papel na regulação da resposta imune e na capacidade de destruir alguns tipos de parasitas;
<p>Basófilo</p>  <p>(Hoffbrand & Moss, 2016)</p>	<ul style="list-style-type: none">• Representam entre 0 a 1% dos leucócitos no sangue periférico;• Possui grandes grânulos citoplasmáticos. Quando corados coram de púrpura escuro;• O núcleo é segmentado, possuindo, normalmente 2 lobos, mas estes são obscurecidos pelos grânulos citoplasmáticos;• Os grânulos citoplasmáticos apresentam substâncias químicas proinflamatórias, como, a histamina e heparina, entre outras. Estas são libertadas após estimulação de células imunes, sendo que a histamina promove a inflamação, e a heparina evita a formação de coágulos.

Tabela 14 (Continuação) - Características e funções gerais dos diferentes leucócitos (Gay-George & Parker, 2003; Hoffbrand & Moss, 2016; Keohane, Smith & WValenga, 2016).

<p style="text-align: center;">Linfócito</p>  <p>(Hoffbrand & Moss, 2016)</p>	<ul style="list-style-type: none">• Representam 20 a 40% dos leucócitos no sangue periférico;• Possuem um núcleo redondo e um citoplasma azul-claro;• Os linfócitos são divididos em 3 grandes grupos: Linfócitos T, Linfócitos B, e células <i>Natural Killer</i>;• Os linfócitos T e B têm um importante papel na resposta imune adquirida;• As funções podem ser atribuídas de acordo com o tipo de linfócito, mas de um modo geral estas consistem na produção de anticorpos contra organismos ou células estranhas; mediam a resposta imunitária contra invasores intra e extracelulares; controlam células tumorais, entre outros.
<p style="text-align: center;">Monócito</p>  <p>(Hoffbrand & Moss, 2016)</p>	<ul style="list-style-type: none">• Representam 3 a 11% dos leucócitos no sangue periférico;• São os leucócitos de maiores dimensões no sangue periférico;• O núcleo é grande e em forma de rim, e possui um citoplasma cinzento-azulado• Quando sai da circulação e entra no tecido origina um macrófago. Devido à complexa conexão dos monócitos e macrófagos no sangue periférico e tecidos, estes são descritos como um sistema, e comumente designados como sistema reticuloendotelial ou sistema mononuclear fagocitário;• Possui numerosas e variadas funções, como, por exemplo, são células apresentadoras de antígeno; sintetizam óxido nítrico, que é um agente citotóxico contra vírus, bactérias, protozoários, e células tumorais; fagocitam bactérias, células mortas, fragmentos celulares ou outros corpos estranhos, entre outras;

J. ANEXO X - Técnica para a realização do esfregaço de sangue periférico

PROCEDIMENTO (Bain, 2006):

1. Colocar uma gota de sangue numa extremidade da lâmina;
2. A um ângulo de 25 a 30° em frente da gota de sangue posicionar uma segunda lâmina;
3. Após o sangue se espalhar ao longo da segunda lâmina, avançar com esta com um movimento suave e firme;
4. Após a secagem do esfregaço, corado pelo *kit Hemacolor*[®] (**Tabela 13**).

Tabela 15 - *Kit Hematolor*[®]

Reagentes	Tempo de imersão (segundos)
Metanol	5
Eosina Y	3
Azure B	6
Solução Tampão de pH 7,2	5

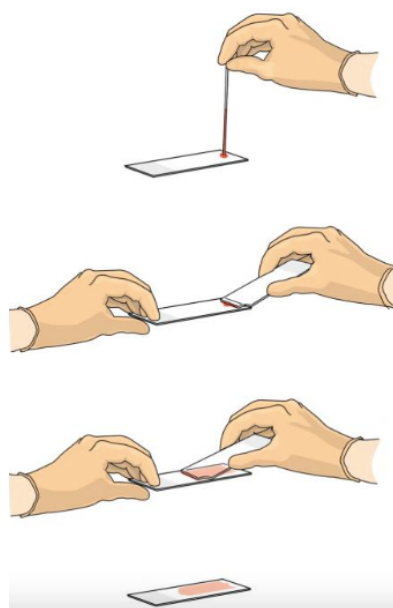


Figura 19 - Técnica para a realização do esfregaço de sangue periférico (Bain, 2006).

K. ANEXO XI - Características morfológicas e associações clínicas relativas a eritrócitos com diferentes formas.

Tabela 16 - Características morfológicas e associações clínicas relativas a eritrócitos com diferentes formas (poiquilocitose) (Adaptado de Bain, *et al.*, 2017; Ford, 2013; Keohane, Smith & Walenga, 2016)



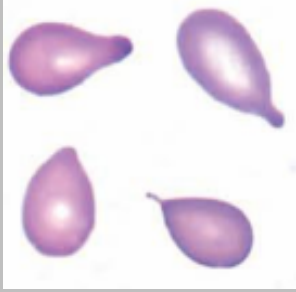
Morfologia	Caraterísticas Morfológicas	Associações Clínicas
<p>Acantócito</p>  <p>(Keohane, Smith & Walenga, 2016)</p>	<p>Eritrócito de tamanho variado, com projeções pontiagudas de diferentes comprimentos</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Hepatopatias • Abetalipoproteinemia; • Deficiência de piruvato quinase.
<p>Células em Alvo</p>  <p>(Keohane, Smith & Walenga, 2016)</p>	<p>O eritrócito possui um círculo vermelho central na área pálida central. Esta morfologia resulta de uma desproporção entre a área de superfície e volume do eritrócito.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Hepatopatia; • Hipobetalipoproteinemia familiar; • Talassemias; • Hemoglobinopatias; • Anemias por deficiência em ferro.
<p>Dacriócitos</p>  <p>Keohane, Smith & Walenga, 2016)</p>	<p>Eritrócitos em forma de lágrima.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Anemia megaloblástica; • Talassemia maior; • Mielofibrose.

Tabela 16 (Continuação) – Características morfológicas e associações clínicas relativas a eritrócitos com diferentes formas (poiquilocitose) (Adaptado de Bain, et al., 2017; Ford, 2013; Keohane, Smith & Walenga, 2016)



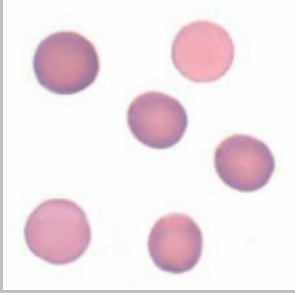
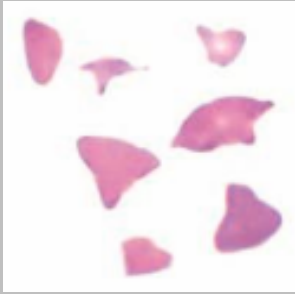
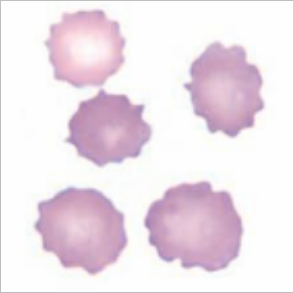

<p>Depranócitos (Células Falciformes)</p>  <p>(Keohane, Smith & Walenga, 2016)</p>	<p>Eritrócito alongado e pontiagudo em cada extremidade. Pode ser curvo.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Depranocitose (Também conhecida por Anemia falciforme ou Doença falciforme).
<p>Eliptócitos</p>  <p>(Keohane, Smith & Walenga, 2016)</p>	<p>Eritrócitos com uma forma em charuto, oval ou elíptica.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Anemias por deficiência em ferro • Anemia megaloblásticas; • Deficiência em piruvato quinase; • Eliptocitose Hereditária; • Talassemia maior.
<p>Esferócitos</p>  <p>(Keohane, Smith & Walenga, 2016)</p>	<p>Eritrócitos de pequenas dimensões, densos, sem palidez central.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Esferocitose Hereditária; • Anemia Hemolítica Autoimune.
<p>Esquizócitos</p>  <p>(Keohane, Smith & Walenga, 2016)</p>	<p>Fragmentos de eritrócito com dimensões e formas variadas. Estes fragmentos normalmente possuem contornos com diferentes ângulos, e por vezes contornos redondos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Anemia microangiopática; • Queimaduras graves.

Tabela 16 (Continuação) – Características morfológicas e associações clínicas relativas a eritrócitos com diferentes formas (poiquilocitose) (Adaptado de Bain, *et al.*, 2017; Ford, 2013; Keohane, Smith & Walenga, 2016)

<p style="text-align: center;">Equinócito</p>  <p>(Keohane, Smith & Walenga, 2016)</p>	<p>Eritrócitos com forma oval cobertos com pequenas espículas. Os equinócitos encontram-se com distribuição regular no esfregaço.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Artefacto; • Uremia; • Deficiência em Piruvato Quinase.
<p style="text-align: center;">Estomatócitos</p>  <p>(Keohane, Smith & Walenga, 2016)</p>	<p>Eritrócitos com a área central pálida com uma forma linear.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Artefacto; • Hepatopatia; • Casos de Alcoolismo; • Estomatocitose Hereditária.