



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Dora Cristina Borrazeiro Boieiro

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Sara Margarida dos Santos Domingues e pela Dra. Maria Gabriel Barroca e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Outubro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Dora Cristina Borrazeiro Boieiro

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Sara Margarida dos Santos Domingues e pela Dra. Maria Gabriel Barroca e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Outubro de 2021

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar, nestas singelas palavras, o meu agradecimento a todas as pessoas que me ajudaram e que caminharam comigo ao longo destes dois anos. Uma viagem que teve obstáculos, preocupações, mas também alegrias e conquistas, ao qual cumpri os meus objetivos e obtive experiência tanto profissional como pessoal.

Em primeiro lugar, quero agradecer à Professora Doutora Ana Miguel Matos, coordenadora do Mestrado em Análises Clínicas, que mesmo com a situação pandémica sempre dispôs disponibilidade para ajudar e apoiar nesta última etapa. Também agradeço a todos os docentes da Faculdade de Farmácia, da Faculdade de Medicina e professores convidados que transmitiram o seu conhecimento para connosco.

Em segundo lugar, quero agradecer à minha orientadora interna Professora Doutora Sara Domingues pela disponibilidade, atenção, dedicação e apoio para a orientação deste projeto.

Agradeço à Dra. Maria Gabriel Barroca, a minha orientadora externa, ao Dr. César Gama e ao Dr. Fernando Calisto pelos ensinamentos que me transmitiram ao longo deste percurso, acessibilidade, simpatia e o voto de confiança que me confienciaram.

A toda a equipa da Synlab Alentejo por me enquadrarem dentro da família, pela boa disposição, confiança e amizade. À minha colega de estágio, a minha amiga Susana, que o futuro nos fez cruzar novamente no mesmo caminho, obrigada pelo apoio e alegria.

Aos meus amigos, em especial à Ana Nunes e Mariana Teles, que mesmo longe sempre me apoiaram e ajudaram em todos os momentos e que me fizeram acreditar em mim.

Ao Diogo Beja, por estar sempre ao meu lado, pela amizade, amor e carinho que tem para comigo e pelo seu apoio incondicional e paciência, e por acreditar sempre em mim.

Por último, à minha família que sempre me apoiou em todas as batalhas e aventuras. Estou grata aos meus Pais pelo apoio incondicional e preocupação que sempre tiveram comigo, ajuda e amor. Ao meu Irmão Tiago, o meu menino, que sempre se orgulhou de mim e que sempre acreditou nos meus sonhos. Agradeço, a eles, a pessoa que sou hoje.

A todos os meus sinceros agradecimentos.

“Think, Believe, Dream, and Dare”

Walt Disney

RESUMO

O presente Relatório de Estágio, tem por base um estágio curricular realizado no Laboratório de Análises Clínicas Synlab Alentejo, em Évora, exercido no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

O objetivo deste relatório consiste em expor a experiência adquirida ao longo do estágio, bem como os conhecimentos adquiridos nas quatro áreas principais de diagnóstico clínico-laboratorial, a Bioquímica, a Imunologia, a Hematologia e Microbiologia.

Ao longo desta experiência, o estágio consistiu na realização e visualização de metodologias realizadas no laboratório, verificação do controlo de qualidade, bem como na apreciação crítica de dados laboratoriais, enquanto estudante e futura mestre de análises clínicas, tendo em perspetiva a saúde e bem-estar dos utentes. Para além disso, o estágio permitiu obter uma boa comunicação e integração na equipa do laboratório, assim como saber lidar no dia-a-dia do laboratório de análises clínicas.

Palavras-chave: Análises Clínicas | Laboratório | Saúde | Microbiologia | Hematologia.

ABSTRACT

The present internship report, it's based on a curricular internship performed in the Clinical Analysis Laboratory Synlab Évora in Alentejo, included under the Master's Degree in Clinical Analysis, Faculty of Pharmacy, University of Coimbra.

The purpose of this report is to describe the experience acquired during the internship as well as the knowledge acquired in the four main areas of clinical and laboratory diagnosis, Biochemistry, Immunology, Hematology and Microbiology.

Throughout this experience, the internship consisted in the realization and visualization of methodologies carried out in the laboratory, verification of quality control, as well as in the critical assessment of laboratory data, as a student and future master of clinical analysis, having in perspective the health and well-being of the patients. Furthermore, the internship allowed good communication and integration in the laboratory team, as well as knowing how to deal with the daily routine of the clinical analysis laboratory.

Keywords: Clinical analysis | Laboratory | Health | Microbiology | Hematology.

SIGLAS, ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

AEQ	Avaliação Externa da Qualidade
AES	Sistema Especialista Avançado, <i>do inglês Advanced Expert System</i>
aPTT	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada <i>do inglês Activated Partial Thromboplastin Time</i>
AST	Teste de sensibilidade a antibióticos, <i>do inglês Antibiotic Sensitivity Test</i>
BHI-T	Caldo Cérebro-coração, <i>do inglês Brain-Heart Infusion</i>
CAM	Gelose Campyloset
CHGM	Concentração de Hemoglobina Globular Média
CLED	Cistina lactose deficiente em eletrólitos
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CMV	Citomegalovírus
COS	Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro
COVID-19	Doença Coronavírus 2019, <i>do inglês Coronavirus Disease 2019</i>
CQI	Controlo da Qualidade Interno
DIG	Diagnóstico imunológico da gravidez
DM	Diabetes Mellitus
DST	Doenças Sexualmente Transmissíveis
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético, <i>do inglês Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
ESP	Esfregaço de Sangue Periférico
GN	Gram-negativo
GP	Gram-positivo
HAE2	Gelose Chocolate Haemophilus
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina A
HbA1c	Hemoglobina glicada
HbF	Hemoglobina fetal
HbS	Hemoglobina S
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HGM	Hemoglobina Globular Média
HIV	Vírus da imunodeficiência humana, <i>do inglês Human Immunodeficiency Virus</i>
Ht	Hematócrito

ICSH	Conselho Internacional de Padronização em Hematologia, <i>do inglês International Committee for Standardization in Hematology</i>
INR	Razão Normalizada Internacional, <i>do inglês International Normalized Ratio</i>
ISO	Organização Internacional para Padronização, <i>do inglês International Organization for Standardization</i>
MCK	Gelose Mac Conkey
MHE	Gelose Mueller Hinton E
MSA2	Gelose Chapman
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia, <i>do inglês Polymerase Chain Reaction</i>
PCT	Plaquetócrito
PVX	Gelose Chocolate PolyViteX
RDW	Índice de Distribuição Eritrocitária, <i>do inglês Red Cell Distribution Width</i>
Rh	Rhesus
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SALM	Gelose chromID Salmonella Elite
SFL	Luz de fluorescência lateral, <i>do inglês Side-fluorescence light</i>
SGC	Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol
SGQ	Sistema de Gestão de Qualidade
SLS	Laurilsulfato de Sódio, <i>do inglês Sodium Lauryl Sulfate</i>
SSD	Luz dispersa lateralmente, <i>do inglês Side-scattered light</i>
STRB	Gelose chromID Strepto B
TF	Fator Tecidual
Todd H-T	Caldo Todd Hewitt c/Antibióticos
TP	Tempo de Protrombina
UFC	Unidade formadora de colónias
VGM	Volume Globular Médio
VPM	Volume Plaquetar Médio
VSE	Velocidade de Sedimentação Eritrocitária
VWF	Fator von Willebrand
XLD	Gelose Xilose Lisina Desoxicolato

ÍNDICE

Agradecimentos	III
Resumo	V
Abstract.....	VII
Siglas, Abreviaturas e Acrónimos.....	IX
Índice	I
Índice de Figuras.....	3
Índice de Tabelas.....	4
1. Introdução	5
2. Caracterização do Laboratório	6
2.1. Enquadramento geral.....	6
2.2. Organização laboratorial	7
2.3. Gestão Laboratorial.....	7
3. Fase Pré-analítica.....	8
4. Controlo de Qualidade	10
4.1. Controlo da Qualidade Interno	11
4.2. Avaliação Externa da Qualidade	12
4.3. Auditorias.....	12
5. Fase Analítica	13
5.1. Bioquímica Clínica	13
5.1.1. Análise dos parâmetros bioquímicos.....	14
5.1.2. Análise sumária de urinas tipo II.....	15
5.1.3. Eletroforese das proteínas séricas	15
5.1.4. Determinação da Hemoglobina glicada.....	16
5.2. Imunologia.....	16
5.2.1. Análise de parâmetros imunológicos	17
5.2.2. Imunohematologia	18
5.3. Hematologia	19
5.3.1. Hematopoiese.....	20
5.3.2. Hemograma.....	22
5.3.3. Esfregaço de sangue periférico	27
5.3.4. Velocidade de Sedimentação Eritrocitária	29
5.3.5. Homeostase	30
5.3.6. Estudo de hemoglobinopatias	36
5.3.7. Caso Clínico de Hematologia	39
5.4. Microbiologia.....	40
5.4.1. Colorações.....	41

5.4.2.	Meios de Cultura.....	42
5.4.3.	Testes de Identificação de Microrganismos.....	43
5.4.4.	Testes de identificação e sensibilidade aos antibióticos.....	46
5.4.5.	Análise cito-bacteriológica de urina	48
5.4.6.	Análise cito-bacteriológica de exsudados urogenitais.....	50
5.4.7.	Análise microbiológica de amostras do trato respiratório.....	55
5.4.8.	Análise bacteriológica de fezes- Coprocultura.....	58
5.4.9.	Exame parasitológico de fezes.....	59
5.4.10.	Testes rápidos.....	60
5.4.11.	Caso Clínico de Microbiologia	61
6.	Fase Pós-analítica.....	61
6.1.	Validação biopatológica	61
6.2.	Armazenamento, conservação e eliminação de amostras biológicas.....	62
7.	Conclusão.....	63
8.	Referências Bibliográficas.....	65
9.	Anexos.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Cristais de oxalato de cálcio monohidratado.....	15
Figura 2 - Diagrama da diferenciação hematopoiética.....	21
Figura 3 - Analisador automático XN-550 da Sysmex.....	22
Figura 4 - Esquema ilustrativo dos três detetores incidindo na amostra.	23
Figura 5 - Histograma de dispersão	23
Figura 6 - Representação gráfica da contagem de eritrócitos.....	24
Figura 7 - Técnica para efetuar o ESP.....	28
Figura 8 - Presença de anisocitose e poiquilocitose no ESP.....	29
Figura 9 - Presença de neutrófilo em banda, linfócitos, eosinófilos e eosinófilos no ESP.	29
Figura 10 - Analisador automático VES-MATIC CUBE 80	30
Figura 11 - Cascata da coagulação, esquematizando a via intrínseca, extrínseca e comum..	32
Figura 12 - Analisador automático CA-620 da Sysmex.....	33
Figura 13 - Teste de solubilidade da HbS	38
Figura 14 - Analisador automático VITEK® 2 Compact da Biomérieux.	46
Figura 15 - Colónias sugestivas de Pseudomonas em meio CLED.....	50
Figura 16 - Colónias sugestivas de S. aureus em gelose COS	58
Figura 17 - Colónias com β -hemólise em gelose COS.....	58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Tubos de colheita mais utilizados na rotina laboratorial consoante a análise laboratorial exigida.....	9
Tabela 2 - Analitos bioquímicos avaliados no aparelho ADVIA 1800.....	14
Tabela 3 - Analitos avaliados no aparelho ADVIA CENTAURY XP.....	17
Tabela 4 - Analitos avaliados no aparelho IMMULITE 2000 XPI.....	18
Tabela 5 - Hemoglobinas predominantes no adulto e a respetiva percentagem	36
Tabela 6 - Valores do hemograma da utente	39
Tabela 7 - Meios de cultura para os respetivos produtos biológicos.....	43
Tabela 8 - Cartas de identificação.....	47
Tabela 9 - Cartas de sensibilidade.....	47
Tabela 10 - Patologias vaginais.....	51
Tabela 11 - Valores de referência do hemograma no laboratório da Synlab Alentejo.....	71
Tabela 12 - Valores de referência no laboratório da Synlab Alentejo.....	71

I. INTRODUÇÃO

As Análises Clínicas envolvem uma vasta análise que consoante o tipo de amostra ou suspeita clínica são realizadas em setores específicos, visando um diagnóstico ou confirmação de alguma patologia e a sua monitorização. A implementação de equipamentos automatizados com métodos mais precisos e sensíveis, permitindo a realização de análises em curto prazo e menor manuseamento humano e assim como as boas práticas laboratoriais por parte do técnico laboratorial são fundamentais tanto para um rápido diagnóstico, como também para uma eficaz monitorização da doença. O laboratório de análises clínicas através da automatização dos processos Pré-analíticos, Analíticos e Pós-analítico, das manutenções diárias, semanais e mensais dos equipamentos e das suas calibrações tem a responsabilidade e o dever de assegurar a obtenção de resultados de rigor e confiáveis para com o utente.

“Que o meu espírito fique claro junto do doente, que nenhum pensamento o distraia de modo a que tenha presente tudo o que a experiência e a ciência lhe ensinaram; porque grandes e sublimes são as pesquisas científicas que têm por fim conservar a saúde e a vida de todos os seres.” (Maimónides, médico do século XII)

A formação de profissionais para a obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas por parte da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra é reforçada a partir da oportunidade de realizar um estágio final curricular. A aquisição de competências, formação avançada e habilidades práticas adquiridas no estágio, confere aos alunos a possibilidade de intervir ao nível da prevenção, diagnóstico e monitorização da doença. Assente nestas diretrizes, o presente estágio curricular decorreu, no período decorrido entre abril de 2021 e setembro de 2021, no laboratório Synlab Alentejo, em Évora.

Mediante o exposto, o presente relatório constitui um exercício onde são retratadas as atividades ao longo do estágio, com descrição da Fase Pré-analítica, Analítica e Pós-analítica. Dentro da fase analítica são abordadas de forma mais geral as valências de Bioquímica Clínica e Imunologia e com mais ênfase as valências de Hematologia e Microbiologia. Assim, a elaboração do relatório de estágio permite ao aluno refletir e sistematizar todos os conhecimentos adquiridos ao longo das unidades curriculares e do estágio final.

2. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO

2.1. ENQUADRAMENTO GERAL

O laboratório Synlab Alentejo, conhecido como o antigo laboratório de Análises Clínicas Flaviano Gusmão, faz parte do grupo SYNLAB, o qual foi criado em 2015 juntamente com a fusão das marcas “Synlab” e “Labco”.^A

O laboratório Synlab Alentejo, que tem sede e laboratório central em Évora, dispõe mais de 50 postos de colheitas localizados no distrito de Évora, Beja e Portalegre. Por outro lado, também dispõe do serviço ao domicílio, serviço aos lares, prestação de apoio a empresas no âmbito da medicina do trabalho e realização de testes de testes de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) e Antígeno da Doença Coronavírus 2019 (COVID-19). O laboratório central tem como horário laboratorial das 8h às 18h de segunda a sexta-feira e das 8h às 12h aos sábados.

A direção técnica do laboratório pertence ao Dr. Fernando Calisto, licenciado em Ciências Farmacêuticas e especialista em Análises Clínicas, responsável pela validação dos resultados da valência de Hematologia. O Dr. César Gama, licenciado em Ciências Farmacêuticas e especialista em Análises Clínicas responsável pela validação dos resultados da valência de Bioquímica Clínica e Imunologia. Por último, a Dra. Maria Gabriel Barroca, licenciada em Ciências Farmacêuticas e especialista em Análises Clínicas responsável pela validação dos resultados da valência de Microbiologia e do controlo de qualidade. O laboratório também é constituído por técnicos superiores de saúde, técnicos de análises clínicas e administrativos.

A Synlab Alentejo é um laboratório com especialidade em Patologia Clínica e encontra-se abrangido pelo sistema de Certificação *Multisite Synlab*. Visa avaliar o desempenho dos trabalhadores, equipamentos e técnicas, assegurando o controlo de qualidade interno e externo para obter resultados eficazes e claros de relevância clínica dos utentes.

^A O grupo SYNLAB tem uma abordagem multidisciplinar com uma gama completa de serviços de laboratório médico a utentes, profissionais de saúde, clínicas e indústria farmacêutica presente em mais de 40 países em quatro continentes, sendo a empresa líder europeu em serviços de laboratório médico.

2.2. ORGANIZAÇÃO LABORATORIAL

O laboratório é constituído por dois pisos, sendo que no piso zero encontra-se a receção, gabinetes de colheitas, sala de triagem e salas de resíduos. Já no outro piso -I, que se refere aos serviços técnicos, encontra-se o setor da microbiologia, setor da hematologia, setor de imunologia, setor da endocrinologia, setor da bioquímica-coagulação, sala de lavagens, armazém, área administrativa, direção técnica, copa, armazém de material, Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) e sala de resíduos.

O fluxo de amostras varia consoante o dia da semana, ou seja, consoante os postos de colheitas entregues no respetivo dia, serviço de hemodiálise, serviço de medicina no trabalho e domicílios, sendo uma média diária de 500 a 600 amostras.

2.3. GESTÃO LABORATORIAL

O laboratório nos diferentes setores dispõe de aparelhos automatizados, que são certificados, calibrados e controlados através de controlos internos. Além disso, através de programas de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) são certificados pelos fabricantes. Ao longo do relatório de estágio, são abordados os aparelhos e metodologias associados a cada sector.

Em relação ao Sistema de água do laboratório, o laboratório da Synlab Alentejo contém o sistema de purificação multifuncional MILLI-Q HX 7000 SD da Merck. Este sistema purifica, armazena, distribui, monitoriza e controla remotamente a água, que a partir da água potável da torneira obtém água pura do tipo 2, alimentando de forma fiável todas as necessidades do laboratório, nomeadamente, equipamentos.



3. FASE PRÉ-ANALÍTICA

Como podemos confiar nos resultados? Muitos utentes questionam a credibilidade dos resultados nos laboratórios de análises clínicas, mas para tal o laboratório clínico deve assegurar que todas as etapas do ciclo analítico sejam cumpridas com um propósito de eliminação de erros significativos nos resultados.

A Norma da Organização Internacional para Padronização (ISO) 15189 de 2012, menciona que nos Laboratórios Clínicos, a fase pré-analítica engloba a requisição do exame, a colheita da amostra, o transporte da amostra, a receção da amostra e por último o seu processamento.¹

Os erros pré-analíticos são fatores que afetam as amostras antes da execução dos testes e se não forem controlados podem levar ao erro. Ao longo dos anos, os laboratórios clínicos obtiveram uma melhoria no desempenho do laboratório, alcançando melhores resultados laboratoriais e redução do tempo de resposta aos utentes.²

O método de identificação das amostras convém ser eficaz e claro, o procedimento de colheitas das amostras, o recipiente onde é realizada a colheita, a temperatura e a segurança do transporte e triagem das amostras no laboratório devem ser monitorizados.³

O laboratório deve informar e esclarecer o utente no processo de preparação e recolha de amostras, aplicando-se critérios estabelecidos de aceitação e rejeição desde a requisição da análise, colheita da amostra e ao seu transporte. A realização das colheitas é efetuada por uma pessoa qualificada, isto é, especialista em análises clínicas, técnico de análises clínicas ou enfermeiro e após verificação do cumprimento de todos os requisitos do processo, é atribuído aos utentes um número de identificação consoante o posto de colheita onde foi efetuada a colheita, através do sistema informático da Synlab Alentejo - *Appolo*. Conforme as análises laboratoriais a que se destinam as amostras que estão nos tubos-contentores colhidos nos laboratórios ou em casa pela própria pessoa, estas seguem para a triagem e são divididas pelas diferentes secções a que se destinam através do código de barras presente na amostra, o qual contém informação das análises a executar. (Tabela I)

Tabela I - Tubos de colheita mais utilizados na rotina laboratorial consoante a análise laboratorial exigida.

Tubo de Colheita	Amostras	Análise Laboratorial
<p>Tubo com citrato de sódio 3.8%</p>  <p>Anticoagulante - Plasma Citrato</p>	Plasma	Provas da coagulação
<p>Tubo Seco</p>  <p>Sem Anticoagulante (com ativador de coágulo na parede do tubo - ativa a cascata de coagulação - e gel separador)</p>	Soro	Bioquímica/ Imunologia-Serologia
<p>Tubo Plasma Fluoretado</p>  <p>Antiglicolítico - Fluoreto de Potássio</p>	Plasma	Bioquímica - Glucose
<p>Tubo EDTA K3</p>  <p>Anticoagulante - Ácido etilenodiamino tetra-acético</p>	Sangue Total	Hematologia/ HbAcI/ Serologia
<p>Contentor para Urina</p> 	Urina Tipo II-Sumária de Urina-Ocasional e Urina Assética-Urocultura	Bioquímica/ Microbiologia
<p>Contentor para Urina</p> 	Urina de 24h	Bioquímica/ Microbiologia
<p>Contentor para fezes</p> 	Fezes	Microbiologia
<p>Contentor próprio/Meio adequado/Zaragatoa</p> 	Outros produtos Biológicos (exsudados vaginais, nasais, uretrais, entre outros)	Microbiologia

Após a colheita, o tratamento pré-analítico das amostras biológicas passa pela sua centrifugação, nomeadamente os tubos de soros são centrifugados durante dez minutos a 4000 rotações por minuto (rpm) e a 20°C. Por outro lado, os tubos de plasma fluoretado e citrato são centrifugados durante quinze minutos a 3000 rpm e a 20°C. Já os tubos de sangue total EDTA-K3 não são centrifugados, mas permanecem em agitação até iniciar a sua análise. Por último, as uroculturas e fezes permanecem refrigeradas até iniciar a sua análise e ao contrário, as urinas do tipo II permanecem à temperatura ambiente.

Os erros na fase pré-analítica podem ser classificados como controláveis ou não controláveis, ou seja, as variáveis não controláveis estão associadas à própria fisiologia do utente, como a idade, sexo e doença.⁴ Por outro lado, estes erros podem ocorrer não apenas na solicitação de exames laboratoriais, isto é, uma solicitação errada ou incorreta dos testes por parte do clínico, como também na má identificação da amostra, tubos errados na colheita, interferência de hemólise, a qual afeta a concentração de Lactato Desidrogenase, Aspartato Aminotransferase, Potássio e Bilirrubina Total, e por último, o volume insuficiente de amostra, presença de coágulo, armazenamento e transporte pouco rigoroso das amostras.^{3,5}

Mediante o exposto, é necessário que toda a informação do processo pré-analítico esteja centralizada no Manual de Colheitas ou documento equivalente presente nos laboratórios a fim de evitar que ocorram os erros pré-analíticos, visto que é nesta fase que existe maior percentagem de erros laboratoriais, cerca de 46-68%.³

Salienta-se ainda que, algumas das análises requisitadas que não se realizam na Synlab Alentejo são enviadas para laboratórios subcontratados concernentes ao mesmo grupo, que se situam em Lisboa, Porto ou Barcelona. É necessário ter atenção em algumas determinações analíticas, pois estas necessitam de estar congeladas, protegidas da luz ou transportadas à temperatura ambiente.

4. CONTROLO DE QUALIDADE

Segundo a Norma ISO 22367 de 2008, o erro laboratorial é definido como uma falha na estratégia planeada que vai ser concluída, ocorrendo em qualquer das fases do ciclo do laboratório.⁶ Neste sentido, é necessário que os laboratórios de Análises Clínicas implementem o Manual do Sistema de Gestão de Qualidade (MSGQ) para ajudar a melhorar o desempenho global, fornecendo aos seus clientes serviços e produtos que vão de encontro às suas necessidades.

No seguimento da implementação do Sistema de Gestão de Qualidade (SGQ), o laboratório deve demonstrar e assegurar que possui qualidade e de acordo com Manual de Boas Práticas Laboratoriais, a garantia da Qualidade é o “conjunto de ações preestabelecidas e sistemáticas necessárias para se obter a garantia de que um produto ou serviço, satisfaz determinadas exigências de qualidade”, abrangendo de forma obrigatória todas as fases do ciclo analítico, incluindo também os procedimentos de Controlo da Qualidade Interno (CQI) e Avaliação Externa da Qualidade (AEQ).⁷ O grupo Synlab dispõe do SGQ que visa a demonstrar a estrutura organizacional, qualidade e o enquadramento da sua atividade no contexto na Norma NP En ISO 9001:2015 e no Manual de Boas Práticas Laboratoriais.

4.1. CONTROLO DA QUALIDADE INTERNO

O Controlo da Qualidade Interno (CQI) não deve ser considerado um procedimento independente para a garantia de qualidade, uma vez que segundo o Manual de Boas Práticas Laboratoriais, o CQI é destacado como um conjunto de ações práticas num laboratório ao qual se destina a assegurar a qualidade dos resultados dos exames laboratoriais durante todo o processo analítico, variando consoante o ensaio e a qualidade que se ambiciona atingir.⁷

O principal objetivo é assegurar a coerência e precisão dos processos analíticos para mais tarde verificar se os resultados dos utentes são fidedignos para serem expressos. A padronização das abordagens de seleção do material a utilizar, regras de controlo e atribuição de cartas de controlo propícia uma redução do número de rejeições de execução de amostras indevidas, melhorando a qualidade dos resultados e favorecendo a harmonização dos serviços de patologia.⁸ Os dados de controlo de qualidade detetam erros aleatórios ou sistemáticos pelo meio da aplicação da regra de Westgard sendo esta um método quantitativo que determina os critérios de aceitação e rejeição em cada tipo de análise.⁹

Portanto, o CQI é um programa intralaboratorial que varia consoante o ensaio, através da análise diária de amostras de controlo de valores analíticos conhecidos comparados em paralelo com as amostras dos utentes na fase analítica, vigiando a incidência dos erros fortuitos e avaliando a precisão dos métodos. Deste modo, permite asseverar a reprodutibilidade dos resultados, avaliar a deterioração gradual dos reagentes, verificar a calibração dos sistemas analíticos e implementação das ações corretivas no caso se verificarem não conformidades.

No laboratório Synlab Alentejo, é realizado diariamente o controlo da temperatura dos frigoríficos e estufas. Já no setor de Bioquímica, Imunologia e Hematologia o CQI é monitorizado diariamente pelo responsável de secção de forma qualitativa e

quantitativamente. Os resultados são registados automaticamente no sistema informático do controlo de qualidade implementado no laboratório, o Unity da Biorad, e através dos valores das respetivas bulas e com a média interna dos resultados estipula-se os limites de aceitação dos controlos, evidenciados por meio das Cartas de controlo Levey-Jennings. No setor de Microbiologia, o controlo de esterilidade da solução salina é realizado quando há preparação de uma nova solução e o controlo das bancadas, estufas e câmara de fluxo laminar é realizado semanalmente, alternando em cada semana. Por fim, é realizado mensalmente o controlo do equipamento automático Vitek® 2 Compact da bioMérieux™ através da utilização de estirpes American Type Culture Collection (ATCC), cuja identificação e testes de suscetibilidade aos antimicrobianos são previamente conhecidos.

4.2. AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE

A Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) é um programa externo ou interlaboratorial reconhecidos por entidades nacionais e internacionais, que segundo o Manual de Boas Práticas Laboratoriais corresponde à avaliação por uma entidade externa da qualidade dos parâmetros fornecidos para cada utente no laboratório. Rigorosamente falando, a organização externa disponibiliza as amostras correspondentes a cada parâmetro para diversos laboratórios, aos quais estes desconhecem os valores das amostras, sendo os resultados obtidos analisados e revistos por especialistas e se subsistir algum desvio no desempenho deverá ocorrer a monitorização e avaliação da implementação de medidas corretivas.⁷

No laboratório Synlab Alentejo, os controlos externos são enviados a nível nacional realizando o Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade dos Laboratórios (PNAEQ) concedido pela entidade externa Instituto Nacional Ricardo Jorge (INSA). Por outro lado, são enviados a nível internacional, tais como o Sociedad Española de Medicina de Laboratorio (SEQC^{ML}), o Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH), o National External Quality Assessment Scheme (NEQAS) e por último o Randox International Quality Assessment Scheme (RIQAS).

4.3. AUDITORIAS

Conforme a Norma ISO 9000 de 2015, a auditoria é um processo sistemático independente e documentado para obter evidência objetiva e respetiva avaliação objetiva, com vista a determinar em que medida os critérios da auditoria são cumpridos.¹⁰

Nesse sentido, no presente laboratório são realizadas auditorias internas em intervalos planeados com vista a determinar se todas as atividades do SGQ estão em conformidade com

o plano estabelecido e com os requisitos da Norma NP EN ISO 9001 e se corrige as irregularidades detetadas para proceder continuamente à melhoria do desempenho do Sistema de Gestão (SG). São também realizadas auditorias externas periodicamente, as quais avaliam os parâmetros da organização dos clientes e registos de conformidade nos postos de colheitas e respetivo laboratório central.

5. FASE ANALÍTICA

A fase analítica engloba todos os procedimentos de execução e os procedimentos que foram validados, sendo que os requisitos especificados devem estar relacionados com o exame pretendido. Nesta fase, que corresponde à realização do exame laboratorial, há monitorização pelo CQI e participação dos programas AEQ.¹¹ Assim, a percentagem de erro laboratorial ocorrido é consideravelmente menor em comparação às duas outras fases do ciclo, uma vez que a maior parte dos ensaios são executados automaticamente e também pelo facto de ser implementado o CQI e AEQ.

Como mencionado anteriormente, o estágio laboratorial engloba as valências de Bioquímica Clínica, Imunologia, Hematologia e Microbiologia, nos quais participei nos procedimentos da fase analítica de cada valência, nomeadamente no processamento das amostras biológicas, no CQI e na manutenção diária dos aparelhos.

5.1. BIOQUÍMICA CLÍNICA

A palavra “Bio” do grego significa “Vida” e assim, a palavra Bioquímica é definida como a ciência da base química da vida. Desta maneira, a bioquímica também é descrita como a ciência dos constituintes químicos das células vivas e das reações e processos que se envolvem.

A bioquímica abrange diversas áreas, nomeadamente biologia molecular, biologia celular e genética molecular. Além disso, a bioquímica e a medicina estão intimamente ligadas, uma vez que a saúde está dependente do equilíbrio harmonioso das reações bioquímicas que ocorrem no nosso organismo, pois o estado de doença reflete anomalias tanto nas biomoléculas, como nos processos ou reações bioquímicas.¹²

Na Synlab Alentejo, esta valência está organizada em quatro setores. De acordo com a metodologia utilizada e a natureza dos parâmetros efetuados, são realizadas análises bioquímicas pelo analisador automático ADVIA 1800, eletroforeses de proteínas e também a monitorização do doente diabético através da determinação da Hemoglobina glicada (HbA1c).

Além disso, a bioquímica das urinas engloba a análise de urinas do tipo II pelo analisador automático AUTION MAX AX-480 e a observação microscópica do sedimento urinário.

5.1.1. Análise dos parâmetros bioquímicos

ADVIA 1800 da Siemens Healthcare Diagnostics é um analisador bioquímico clínico automático de diagnóstico *in vitro* que processa testes em soro, plasma (tubo de fluoreto de potássio) e urinas de origem humana do tipo II e 24 horas. Este analisador, está ligado ao aparelho VersaCell, que após a leitura do código de barras das amostras envia-as, consoante as análises solicitadas, para o aparelho ADVIA 1800 ou para o aparelho ADVIA CENTAURY XP (aparelho associado à valência de imunologia).

As técnicas analíticas utilizadas por este aparelho baseiam-se nos métodos colorimétricos e imunoturbidimetria com leitura por espectrofotometria. Por outro lado, o eletrodo seletivo de iões (ISE), utiliza a potenciometria que efetua determinações quantitativas dos iões. Na Tabela 2, encontram-se representados os analitos avaliados no laboratório com a respetiva função e o tipo de amostra utilizada.

Tabela 2 - Analitos bioquímicos avaliados no aparelho ADVIA 1800.

Metabolismo/ Função	Determinação Analítica	Amostra
Lípidos	Colesterol Total, Colesterol HDL, Colesterol LDL e Triglicéridos	Soro
Glúcidos	Glucose Micro-albuminúria	Plasma
		Urina ocasional/24h
Proteico	Proteínas Totais, Albumina, Fator reumatoide, Antiestreptolisina O e Proteína C Reativa	Soro
Renal	Ácido Úrico, Creatinina e Azoto Ureico	Soro e Urina ocasional/Urina 24h
Pancreática	Amilase	
Hepática	Alanina Aminotransferase, Aspartato Aminotransferase, Gamaglutamil transferase, Fosfatase Alcalina, Bilirrubina Direta e Total	Soro
Cardíaca	Creatinina Quinase e Lactato Desidrogenase	
Ferro	Ferro, Transferrina, Capacidade Total de Fixação do Ferro	
Fosfo-cálcio; Eletrólitos e Oligoelementos	Cálcio e Fósforo inorgânico; Ionograma, Magnésio, Cloro e Urease	Soro e Urina ocasional/Urina 24h

5.1.2. Análise sumária de urinas tipo II

A urianálise é realizada pelo analisador automático AUTION MAX AX-4280, da Menarini. Esta avaliação é importante no exame clínico do utente, proporcionando informações sobre patologias renais e do trato urinário.¹³ Para a análise sumária de urina tipo II, é necessário colher a primeira urina da manhã para um recipiente estéril e esta engloba a análise da aparência da amostra, o exame físico e análise bioquímica e o exame microscópico do sedimento urinário.

A amostra de urina antes da colocação no aparelho deve ser mantida à temperatura ambiente, agitada e nunca centrifugada. O aparelho realiza o teste bioquímico da urina através de tiras-teste e permite avaliar se há presença de glicose, bilirrubina, urobilinogénio, corpos cetónicos, proteína, hematuria, nitrito, leucócitos e concentração dos iões de hidrogénio, ou seja, medição do pH. Para além disso, para o exame físico, o aparelho também efetua a medição de forma automática da coloração, da turbidez, tendo como base a quantidade de luz difundida pela amostra e a gravidade específica através da medição dos ângulos de refração da luz.^{13, 14}

Após a determinação dos parâmetros bioquímicos é realizado o exame microscópico do sedimento urinário para efetuar a identificação e contagem de elementos não solúveis presentes na urina, como eritrócitos, leucócitos, cilindros, cristais, células, bactérias e fungos. (Figura 1) Para o sedimento, a urina é centrifugada pelo menos a 1500 rpm durante 5 minutos, decantando o sobrenadante. A observação ao microscópio é realizada entre lâmina e lamela, utilizando a objetiva de 10x e depois de 40x.¹⁵

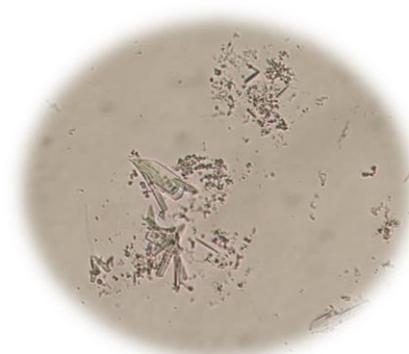


Figura 1 - Cristais de oxalato de cálcio monoidratado. Observação realizada ao microscópio na Synlab Alentejo.

5.1.3. Eletroforese das proteínas séricas

Consoante a sua concentração e estrutura das proteínas plasmáticas, as suas alterações são úteis para o diagnóstico e monitorização de doenças. A eletroforese das proteínas séricas é usada na rotina dos laboratórios de análises clínicas, com vista à deteção de anomalias do perfil proteico, podendo refletir mudanças na carga ou no tamanho molecular das proteínas devido a alterações estruturais, frequentemente de origem genética.¹⁶

Na Synlab Alentejo, é utilizado o aparelho HYDRASYS da Sebia para a eletroforese de proteínas e hemoglobinas (dissertado detalhadamente em 5.3.6). Este aparelho permite uma avaliação aproximada de rotina da concentração de cinco frações principais de mobilidade

diferente, de acordo com a sua carga a um determinado pH, através da separação em meio alcalino (pH 9,1), por eletroforese em gel de agarose. São utilizadas amostras de soro fresco e após a migração com posterior corante e descorante do gel há quantificação das frações albumina, alfa-1 globulinas, alfa-2 globulinas, beta globulinas e gama globulinas. A quantificação é efetuada por densitometria e a análise dos perfis eletroforéticos é realizada num sistema informático do próprio analisador que está implementado no laboratório.

5.1.4. Determinação da Hemoglobina glicada

A diabetes *mellitus* (DM) pertence ao grupo dos distúrbios metabólicos comuns que partilham o fenótipo da hiperglicemia. A complexa interação entre a genética e os fatores ambientais pode resultar de diferentes tipos de DM e os fatores que contribuem para a hiperglicemia podem ser desde a deficiência na secreção de insulina, diminuição da utilização de glicose ou até um aumento da produção de glicose.¹⁷

As proteínas glicadas formam-se a partir da hiperglicemia, ou seja, do excesso de glucose que existe em circulação, que proporciona a ligação não enzimática da glucose a proteínas de forma irreversível sob condições fisiológicas. A glucose em excesso liga-se à hemoglobina A (HbA) e pela sua separação cromatográfica, identificam-se várias variantes, nomeadamente a HbA1a, HbA1b e HbA1c, as quais formam as hemoglobinas glicadas. A HbA1c é a que existe em maior quantidade, determinando assim a glicémia média dos dois últimos meses, isto é, reflete a meia-vida da hemoglobina (Hb).¹⁴

Na Synlab Alentejo, a determinação da HbA1c é determinada a partir do aparelho Variant Turbo II da Bio-Rad. O aparelho utiliza os princípios da cromatografia líquida de alta eficiência por troca iónica (HPLC), que através das amostras de sangue total em tubo de EDTA-K3 permitem a identificação e quantificação das várias frações da Hb, como a HbA1a, HbA1b, HbA1c e Hemoglobina fetal (HbF).

5.2. **IMUNOLOGIA**

O termo imunidade deriva da palavra latina *immunitas*, que significa proteção contra doenças, sendo mais especificamente contra doenças infecciosas, ou seja, a imunidade é o somatório de todos os mecanismos de defesa que o organismo dispõe para nos proteger.¹⁸ O nosso organismo possui um importante sistema imunológico, constituído por órgãos linfoides primários e secundários, uma variedade enorme de células, tecidos e múltiplos fatores solúveis.¹⁹ Por conseguinte, a resposta coordenada e coletivas das células e moléculas do

sistema imunológico contra as substâncias que reconhecem como estranhas ao organismo desencadeiam uma resposta imunológica.

Do ponto de vista da resposta imunológica, as consequências podem ser positivas ou negativas. Uma resposta positiva é quando o agente agressor é eliminado e estabelece-se o equilíbrio ou homeostasia, ocorrendo uma inflamação aguda com desenvolvimento de memória imunológica. Por outro lado, uma resposta negativa é quando o agente agressor não é eliminado e podendo estar associado a imunopatologias, com desenvolvimento de uma inflamação crónica que causa desenvolvimento de hipersensibilidade e processos autoimunes.¹⁹

No laboratório da Synlab Alentejo, a valência da imunologia está associada ao estudo das hipersensibilidades, serologia infecciosa, pesquisa de marcadores tumorais, estudo endocrinológico e imunohematologia por reações de aglutinação antigénio-anticorpo. Os aparelhos existentes para esta valência são o ADVIA CENTAURY XP, IMMULITE 2000 XPi, VIDAS da Biomerieux e Banjo ID-Reader da Bio-Rad.

5.2.1. Análise de parâmetros imunológicos

a) **ADVIA CENTAURY da Siemens Healthcare Diagnostics**

O ADVIA CENTAURY é um analisador com sistema de imunoensaio que processa testes em soro e plasma. As amostras podem ser colocadas diretamente no analisador através de uma rack ou podem, como foi mencionado anteriormente, ser enviadas através do aparelho VersaCell após a leitura do código de barras. A técnica analítica utilizada por este aparelho baseia-se na quimiluminescência direta usando a tecnologia *Acridinium Ester*. Na Tabela 3, encontram-se representados os analitos avaliados no laboratório, referente ao respetivo diagnóstico utilizando como amostra o soro.

Tabela 3 - Analitos avaliados no aparelho ADVIA CENTAURY XP.

Diagnóstico	Determinação Analítica
Anemia	Vitamina B12 e Folatos
Metabolismo Ósseo	Hormona Paratiroide
Hepatites	Anticorpos anti-Hepatite B, Antígeno de superfície da Hepatite B e Vírus da Hepatite C
Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)	Antígeno e Anticorpo do HIV
Marcadores Tumorais	Alfa-fetoproteína, CA 125, CA 19-9 e Antígeno Carcinoembrionário
Endocrinologia	Alfa-fetoproteína, Hormona Folículo-estimulante, Hormona Luteinizante, Progesterona, Prolactina e Estradiol
Tiroide	Tiroxina e Triiodotironina livre, Tiroxina e Triiodotironina Total e Hormona Estimulante da Tiroide

b) IMMULITE 2000 XPi da Siemens Healthcare Diagnostics

O IMMULITE 2000 XPi é um analisador com sistema de imunoensaio que processa testes em soro e plasma. As amostras podem ser colocadas diretamente no analisador através de uma rack. A técnica analítica utilizada por este aparelho baseia-se na tecnologia de Imunoensaio de Quimiluminescência Amplificada por Enzima (CLIA). Na Tabela 4, encontram-se representados os analitos avaliados no laboratório, referente ao respetivo diagnóstico utilizando como amostra o soro.

Tabela 4 - Analitos avaliados no aparelho IMMULITE 2000 XPi.

Diagnóstico	Determinação Analítica
Alergia	Imunoglobulina E
Metabolismo	Cortisol
Endocrinologia	Gonadotrofina Coriónica Humana e Testosterona
Cardíaco	Proteína C-Reativa
Marcadores Tumorais	Antigénio Específico da Próstata livre e total
Tiroide	Anticorpos Antitireoglobulina e Anticorpos Antitireoperoxidase
Doenças infecciosas	Citomegalovírus para Imunoglobulina G (CMV IgG), CMV para Imunoglobulina M (IgM), Rubéola IgG, Rubéola IgM, Toxoplasma IgG e Toxoplasma IgM

c) VIDAS da Biomerieux

No laboratório da Synlab Alentejo, o imunoanalisador VIDAS é utilizado sempre que existe resultados duvidosos por parte dos analitos Toxoplasmose, Rubéola, CMV, Antigénio de superfície da Hepatite B e HIV, isto é, serve para determinar a sua avidéz e como confirmatório. Todos os testes são em formato mono-teste, ou seja, um teste para um doente. Este analisador, utiliza como base o Teste Imunoenzimático por Fluorescência (ELFA).

5.2.2. Imunohematologia

A imunohematologia estuda as moléculas antigénicas presentes nos componentes celulares e solúveis do sangue total, assim como também o estudo dos anticorpos e as interações antigénio-anticorpo. Os grupos sanguíneos e problemas imunohematológicos são importantes, uma vez que a transfusão de sangue consiste na transferência “segura” de componentes sanguíneos de um dador a um recetor.²⁰ O sistema ABO é constituído pelo gene ABO e existem quatro fenótipos distintos associados a este sistema, isto é, A, B, 0 e AB. Assim, os anticorpos

produzidos contra os antígenos do grupo ABO são encontrados no soro de indivíduos que não possuem esses antígenos.²¹

Na secção de imunohematologia da Synlab Alentejo, é realizada a fenotipagem sanguínea ABO/RhD, o teste da antiglobulina humana e a deteção de anticorpos relativamente ao vírus de *Epstein Barr*, que causa a Mononucleose Infeciosa, ao género bacteriano *Proteus*, ao Fator Reumatoide e à bactéria *Treponema pallidum*, que causa a sífilis. Todas as técnicas efetuadas nesta secção são realizadas através de técnicas baseadas na aglutinação. Para o procedimento da fenotipagem sanguínea ABO/RhD são utilizados os Card-ID “DionClon ABO/D + Reverse Grouping” da Bio-Rad para a determinação do grupo sanguíneo e a prova reversa para a determinação do RhD.

Por outro lado, para o procedimento do teste da antiglobulina humana, isto é, Coombs Direto e Indireto, são utilizados os Card-ID LISS/CCoombs da Bio-Rad. Ambos os procedimentos são lidos num leitor automático. Por fim, as restantes deteções são realizadas através da colocação de uma gota de soro num quadrante mais o respetivo reagente e após a agitação observa-se a presença de aglutinação ou a sua ausência.

5.3. HEMATOLOGIA

A hematologia é o ramo da ciência que diz respeito ao estudo das células sanguíneas, como os eritrócitos, leucócitos e plaquetas, ao estudo dos órgãos que produzem os componentes sanguíneos, isto é, os órgãos hematopoiéticos, como a medula óssea, o baço e os gânglios linfáticos e ao estudo das doenças associadas a estes elementos, entre elas as anemias, as leucemias, os linfomas, o mieloma múltiplo e alterações na coagulação.

O sangue é designado como a suspensão de células num líquido complexo, o plasma. Por outras palavras, o sangue obtido do utente é o sangue total que por sua vez vai coagular e depois centrifugar, do qual se obtêm como sobrenadante o soro, depois o gel separador e por último o coágulo. No entanto, se o sangue colhido for colocado num tubo com anticoagulante, após a centrifugação, devido às densidades diferentes, obtêm-se um sobrenadante de sangue anticoagulado, titulado como plasma, depois leucócitos e plaquetas e por fim os eritrócitos. Mediante o exposto, pode-se citar que o plasma é a parte fluida do sangue e difere do soro porque contém fatores de coagulação, como o fibrinogénio, fator V e VIII.^{4, 14}

Na secção de hematologia da Synlab Alentejo são realizados os hemogramas, determinadas as velocidades de sedimentação eritrocitária, os estudos de coagulação, nomeadamente a

determinação da Razão Normalizada Internacional (INR), do Tempo de Protrombina (TP) e do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (aPTT). Para além disso, são realizados também o estudo de hemoglobinopatias, com a realização de eletroforeses de hemoglobinas e pesquisa de hemoglobina S, através do teste de falciformação.

Na rotina laboratorial diária é efetuada a receção da amostra previamente triada, verificando se cada amostra vai ao encontro das condições necessárias para um correto processamento desta, isto é, averiguar se a amostra possui o volume suficiente e inexistência de coágulo ou fibrina. Após a verificação, segue-se a quantificação das amostras nos respetivos aparelhos ou técnicas de acordo com os parâmetros solicitados.

5.3.1. Hematopoiese

As células sanguíneas (glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas) originam-se na medula óssea por meio de um processo complexo de diferenciação e maturação celular. Os eritrócitos ou glóbulos vermelhos têm uma vida média de 120 dias e a sua função principal é o transporte de oxigénio dos pulmões aos tecidos e transporte do dióxido de carbono no sentido inverso. Em segundo lugar, temos os leucócitos ou glóbulos brancos que tem uma vida média variada e constituem quatro tipo de fagocíticos, os neutrófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos e têm como função a proteção contra agentes estranhos ao organismo ou processos cancerígenos. Por último, temos as plaquetas que circulam no organismo durante dez dias e estão envolvidas na homeostasia, pois participam ativamente na coagulação, impedindo hemorragias.²³

O processo de formação e desenvolvimento de diversos tipos de células sanguíneas designa-se por hematopoiese. A participação das moléculas de adesão celular, presentes nas células hematopoiéticas, nas células do estroma e na matriz extracelular, também é essencial. A hematopoiese inicia-se com uma célula-tronco pluripotente, a célula estaminal hematopoiética que tem capacidade de diferenciação, autorrenovação e proliferação. Devido às células do estroma da medula óssea, a hematopoiese ocorre num microambiente adequado, originando duas linhagens de células estaminais mais especializadas, a célula progenitora mieloide e a célula progenitora linfoide.²² Na Figura 2 observa-se o esquema da diferenciação hematopoiética.

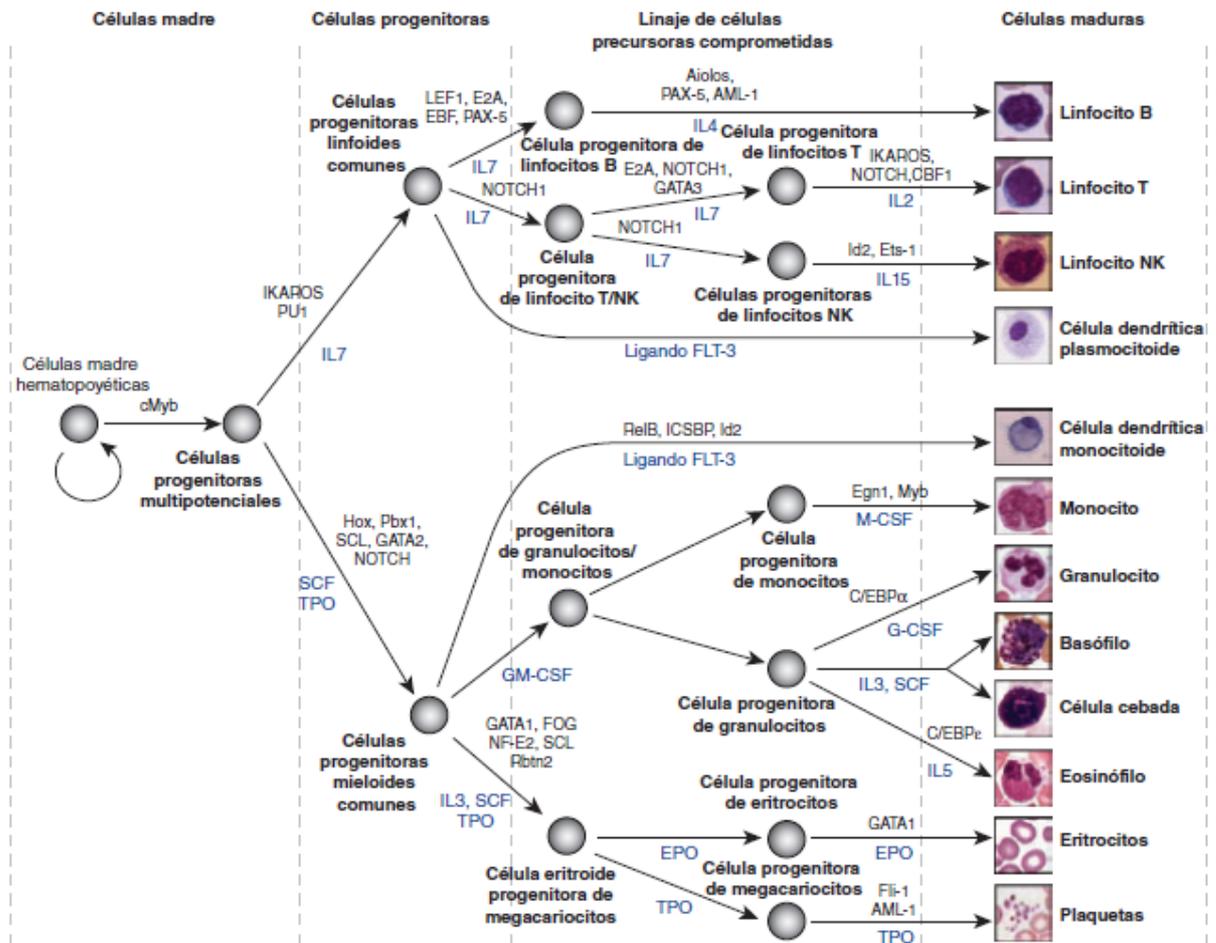


Figura 2 - Diagrama da diferenciação hematopoiética. Observação da célula-tronco pluripotente e a diferenciação e maturação de duas linhagens progenitoras através de estímulos específicos, os fatores de crescimento e de transcrição. [26]

Os fatores de crescimento hematopoiéticos controlam o processo de hematopoiese, regulando a proliferação e diferenciação das células progenitoras hematopoiéticas e a função das células maduras. Podem também estimular a maturação e diferenciação celular, suprimir a apoptose e afetar a função de células maduras. Verifica-se que a linhagem linfocítica origina os linfócitos B, os linfócitos T e as células NK e a linhagem mieloide que inclui a produção de várias células maduras, origina a linhagem eritrocitária, megacariocítica, granulocítica e monocítica.²³

A medula óssea e o timo são designados como órgãos linfoides primários, mas os linfócitos B amadureçam na medula óssea, enquanto os linfócitos T amadureçam no timo. Por outro lado, na medula óssea existem células imaturas-precursoras e no sangue periférico existem células maduras.

5.3.2. Hemograma

Entre as análises de rotina mais frequentemente solicitadas pelo médico assistente, está o hemograma, pois a partir de uma colheita de sangue obtém-se informações preciosas sobre o estado geral de saúde do utente, quer seja no acompanhamento de doenças ou no diagnóstico de anemias, infeções, alterações da medula óssea ou das plaquetas e inflamações, assim como nas doenças crónicas.

O hemograma é facilmente solicitado e interpretado e a automatização do hemograma viabiliza resultados mais claros e precisos, como informações diferenciais, nomeadamente as percentagens e números absolutos de diferentes subgrupos de leucócitos.²⁴

Na Synlab Alentejo, o processamento dos hemogramas é realizado através do aparelho automático XN-550 da Sysmex (Figura 3). Recorre-se a amostras de sangue total colhidas para tubos com anticoagulante EDTA-K3 para uma avaliação quantitativa e qualitativa dos componentes sanguíneos, uma vez que faz a preservação das células sanguíneas impede a coagulação devido ao facto do anticoagulante ser um quelante de Ca^{2+} , isto é, fixa-o a nível do sangue. As amostras são colocadas em agitação antes de serem introduzidas no aparelho.



Figura 3 - Analisador automático XN-550 da Sysmex. [25]

O analisador automático dispõe de um carregamento contínuo de amostras que permite o aumento da produtividade, otimizando o fluxo de trabalho. Realiza a análise qualitativa e quantitativa das várias linhagens celulares, quantificando o Eritrograma, Leucograma e Plaquetas. As determinações dos diferentes parâmetros mencionados são realizadas através de diferentes princípios e tecnologias.

Em anexo estão disponibilizados os valores de referência do hemograma seguidos na Synlab Alentejo (Anexo I).

Método de Citometria de Fluxo por Fluorescência

A citometria de fluxo por fluorescência quantifica as propriedades físicas e químicas de células e partículas e o aparelho XN-550 utiliza este método para a contagem e diferenciação dos leucócitos. Cada amostra é examinada enquanto fluem através de uma célula de fluxo estreita e os eritrócitos são hemolisados e as membranas celulares dos leucócitos são perfuradas. O

aparelho utiliza marcadores fluorescentes que se ligam especificamente aos ácidos nucleicos presentes em cada célula.

Cada célula passa por um laser de 633 nm e ao serem captadas por este geram um sinal que permite a quantificação e classificação através de três detetores, especificamente, a Luz dispersa frontalmente (FSC) que avalia o número e tamanho celular, a Luz dispersa lateralmente (SSD) que avalia a complexidade intracelular e por último, a Luz de fluorescência lateral (SFL) que avalia o tipo e quantidade de ácido nucleico e organelos celulares. Esses três sinais são usados para diferenciar e contar leucócitos, glóbulos vermelhos nucleados, reticulócitos e plaquetas, e também para detetar células anômalas e células imaturas (Figura 4).²⁶

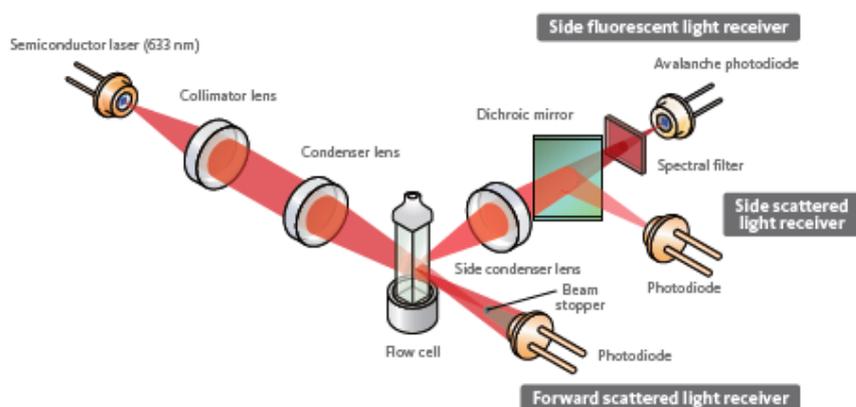


Figura 4 - Esquema ilustrativo dos três detetores incidindo na amostra. [26]

O analisador articula as informações recolhidas da amostra pelos três detetores e o resultado é representado através de histogramas de dispersão, sendo possível identificar as diferentes populações de leucócitos. Na Figura 5 está representado um histograma de dispersão, em que no eixo do y está representado o conteúdo dos ácidos nucleicos (detetor SFL) em função do eixo do x, ou seja, do tamanho da célula (detetor SSC).²⁶

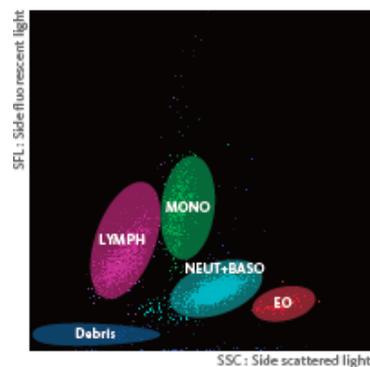


Figura 5 - Histograma de dispersão. [26]

Método SLS – Doseamento da hemoglobina

Segundo o Conselho Internacional de Padronização em Hematologia (ICSH), para determinar o doseamento da hemoglobina no sangue, o método de referência é cianometahemoglobina. No entanto, o cianeto é uma toxina mitocondrial, causando uma das intoxicações mais letais para o humano. Assim, devido às preocupações existentes na utilização desta toxina, no analisador XN-550 o método de detecção da hemoglobina utilizado é o Laurilsulfato de Sódio

(SLS) sem cianeto. O reagente SLS, atua como surfactante que lisa os eritrócitos e leucócitos presentes na amostra para que ocorra a liberação de hemoglobina.²⁶

A reação química inicia-se com a ligação dos grupos hidrofóbicos do surfactante às cadeias de globina da hemoglobina, que converte o ferro ferroso (Fe^{2+}) a ferro férrico (Fe^{3+}), isto é, oxidado, e a molécula de hemoglobina modifica-se para metahemoglobina. A metahemoglobina liga-se ao SLS, formando um complexo corado que é medido por espectrofotometria a 555 nm. A concentração de Hb da amostra é proporcional à absorção.²⁶

Método de impedância com focagem hidrodinâmica

O método de impedância com focagem hidrodinâmica permite realizar a contagem precisa e a determinação do tamanho dos eritrócitos e plaquetas, através de uma corrente contínua. Uma parte da amostra é aspirada e diluída numa solução condutora de eletricidade e as células sanguíneas passam pelo centro de abertura, gerando impulsos elétricos que transmitem informações sobre o volume celular. Na corrente contínua existe um campo elétrico composto por dois eletrodos de carga oposta, que origina uma alteração do potencial elétrico, isto é, há uma diminuição da resistência, que por sua vez, tem como efeito um aumento de tensão entre os eletrodos, sendo esta proporcional ao volume da célula.²⁶

O analisador converte os sinais elétricos produzidos em representações gráficas, como está representado na Figura 6. Este método, para além de efetuar a contagem dos eritrocitos e plaquetas, também faz a determinação do Ht e do VGM.²⁶

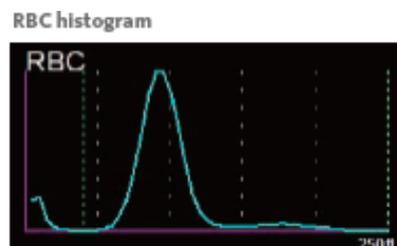


Figura 6 - Representação gráfica da contagem de eritrócitos. [26]

a) Eritrograma

O eritrograma representa o estudo quantitativo, qualitativo e citológico das células da série vermelha do sangue.

❖ Eritrócito ou glóbulo vermelho

Pela microcirculação, o eritrócito mantém a Hb na forma reduzida (ferrosa) para que esta esteja em contacto estreito com os tecidos. Assim, este parâmetro laboratorial representa o número total de eritrócitos por unidade de volume de sangue total. É expresso em número de células por litro (células/L).²³

❖ Hematócrito

O hematócrito (Ht), uma vez que é um parâmetro que mede o volume total de eritrócitos em relação ao volume total de células sanguíneas, fornecendo uma estimativa do grau de anemia. Corresponde à percentagem de sangue ocupado pelos eritrócitos, isto é, por exemplo, um valor de 37% de hematócrito, corresponde ao volume dos eritrócitos e os restantes 63% correspondem a outros componentes celulares, como água. É expresso em percentagem (%).^{22, 24}

❖ Hemoglobina

A Hb é a principal proteína dos glóbulos vermelhos e tem como principal função transportar oxigénio e dióxido de carbono e a sua dosagem permite quantificar e avaliar a presença de anemias. O valor da Hb varia consoante o sexo do utente. É expressa em gramas por decilitro (g/dl).²²

❖ Volume Globular Médio

O volume globular médio (VGM) é a medida do tamanho médio do eritrócito, o qual é calculado a partir da contagem total de eritrócitos e do hematócrito. Permite avaliar as anemias como microcíticas, normocíticas ou macrocíticas. É expresso em femtolitros (fL).²²

❖ Hemoglobina Globular Média (HGM)

A hemoglobina globular média (HGM), representa a quantidade média de Hb que existe em cada eritrócito, sendo calculada a partir da quantidade de Hb e da contagem de eritrócitos. É útil na avaliação das anemias, classificando-as como hipocrómicas, normocrómicas ou hiperocrómicas. É expressa em picogramas (pg).²⁴

❖ Concentração de Hemoglobina Globular Média

A concentração de hemoglobina globular média (CHGM), avalia a concentração média de Hb por eritrócito e é expressa em grama por decilitro (g/dl). Corresponde ao rácio entre a quantidade de Hb e a percentagem do hematócrito.²⁴

❖ Índice de Distribuição Eritrocitária

O índice de distribuição eritrocitária (RDW), permite avaliar a variação do tamanho entre os eritrócitos, isto é, a partir dos histogramas dos eritrócitos avalia a largura de distribuição destes. É o índice de anisocitose eritrocitária, representando a heterogeneidade de distribuição do tamanho das hemácias. Estabelece um diagnóstico entre diferentes anemias,

nomeadamente anemias por falta de produção, por excesso de produção ou por perdas sanguíneas. É expresso em percentagem.²⁴

❖ Reticulócitos

Os reticulócitos, são designados como os últimos precursores dos eritrócitos. Formados na medula óssea, são depois libertados para a circulação sanguínea, e em dois dias tornam-se eritrócitos maduros. No seu interior, contêm ácido ribonucleico (RNA) remanescente e estes devem ser avaliados em todos os casos de anemia, porque fornecem informações sobre a medula óssea, isto é, permite avaliar a capacidade da eritropoiese da medula óssea. Se existir uma diminuição do número de reticulócitos pode sugerir uma produção inadequada de eritrócitos na medula óssea (anemia hiporregenerativa) e o oposto pode indicar perda de sangue ou destruição de eritrócitos (anemia hiperregenerativa). É expresso em percentagem e em número absoluto.²⁴

b) Leucograma

O leucograma representa o estudo quantitativo, qualitativo e citológico das células da série branca do sangue.

❖ Leucócitos ou glóbulos brancos

Os leucócitos são o número total por unidade de volume no sangue total. Uma diminuição corresponde a uma leucopenia e um aumento a uma leucocitose, apresentando significado clínico, nomeadamente infeções ou leucemias. Por outro lado, fatores como idade, temperatura corporal e exercício também influenciam a contagem dos leucócitos. É expresso em células/L.²⁴

❖ População de leucócitos

A população de leucócitos, representa a contagem diferencial de leucócitos, distinguindo os polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) dos mononucleares (monócitos e linfócitos). Os resultados são expressos em contagem relativa (%) e contagem absoluta (células/L). Normalmente, as subpopulações de leucócitos são facilmente visualizadas no esfregaço de sangue periférico, mas se visualizar no histograma um desvio para a esquerda do pico há presença de células imaturas ou aglomerados de plaquetas, por exemplo. Portanto, a alteração quantitativa das subpopulações de leucócitos orienta para o diagnóstico de doenças infecciosas, inflamatórias e processos proliferativos.^{22, 24}

c) Plaquetas

As plaquetas, são elementos de menores dimensões formadas no sangue periférico, que tem na sua composição fragmentos citoplasmáticos dos megacariócitos e são anucleadas. Têm funções importantes na coagulação, pois são o primeiro mecanismo a tentar bloquear quando há uma lesão no vaso sanguíneo, agrupando-se de modo a formar um pequeno trombo para estancar a hemorragia.²²

❖ Volume Plaquetar Médio

O volume plaquetar médio (VPM), corresponde à variabilidade do tamanho das plaquetas numa amostra, sendo que uma diminuição indica uma trombocitopenia e está associado a um problema a nível das plaquetas e um aumento a uma trombocitose, que está associado a uma destruição periférica das plaquetas. É expresso em fentolítros (fL).²²

❖ Plaquetócrito

O plaquetócrito (PCT), corresponde à percentagem de sangue ocupado pelas plaquetas. No caso de ser utilizado sangue anticoagulado, as plaquetas distribuem-se uniformemente por toda a parte, mas pode apresentar aglutinação plaquetária, atribuindo uma falsa trombocitopenia e assim é necessário a observação do esfregaço de sangue periférico. É expresso em percentagem.²²

Por último, é necessário ter atenção a algumas considerações. O valor do Ht pode ser alterado se no tubo de colheita houver um excesso de EDTA ou presença de coágulos, ocorrendo uma diminuição do seu valor, com aumento do valor da HGM. Também a análise da amostra após seis a oito horas da colheita aumenta o valor do Ht. O valor da Hb fica alterado quando há presença de uma leucocitose marcada ou por amostras lipémicas, uma vez que há produção de turbidez, afetando a leitura. Por outro lado, o MCHC pode estar falsamente aumentado em amostras lipémicas ou ictéricas.^{22, 24}

5.3.3. Esfregaço de sangue periférico

O esfregaço de sangue periférico (ESP) é um método simples e barato que fornece informações importantes do estudo inicial de várias patologias hematológicas da série vermelha, série branca e plaquetas, possibilitando também a confirmação visual dos resultados.

27

O ESP tem como objetivo a contagem e identificação de anomalias nas células sanguíneas, com a colocação de uma gota de sangue total recolhido em tubo EDTA K3 devidamente

homogeneizado numa extremidade da lâmina. Posteriormente, com o auxílio de outra lâmina com inclinação 30-45°, procede-se ao espalhamento da gota de sangue num único movimento uniforme para que o esfregaço fique com a espessura mais fina desde a cabeça até à cauda. (Figura 7) Um bom esfregaço é liso, regular e homogéneo, pois permite que exista uma área para a observação das células.

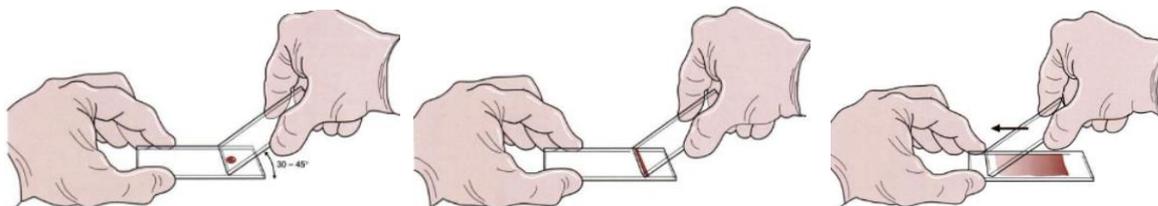


Figura 7 - Técnica para efetuar o ESP. [28]

Na Synlab Alentejo, o ESP é avaliado por especialistas, quando os hemogramas assinalam alterações, como trombocitopenia, trombocitose, leucopenia, leucocitose ou quando é solicitado pelo clínico.

São corados pelo método de May-Grünwald-Giemsa. O corante de May-Grünwald é uma solução metanólica de eosinato de azul de metileno, ou seja, é uma mistura de corantes de características neutras que coram os componentes citoplasmáticos e nucleares das células. Após a secagem do espalhamento da gota de sangue, as lâminas são colocadas numa tina de vidro contendo a solução de May-Grünwald durante três minutos, depois retira-se o excesso de corante e as lâminas são imersas novamente com o tampão de fosfato de pH 7,0/7,2 junto à solução durante três minutos. Seguidamente, retira-se o meio e coloca-se a solução de Giemsa diluída durante quinze minutos. Esta coloração é considerada policromática, uma vez que contém eosina e azul de metileno e as reações entre ambos dependem do valor do pH, isto é, o tampão de fosfato vai dissociar o eosinato de azul de metileno em eosina e azul de metileno. O azul metileno é o corante básico que cora de azul os componentes ácidos (e basófilos) das células, como o núcleo e RNA. Por outro lado, a eosina é o corante ácido que cora de vermelho ou rosa-alaranjado os componentes básicos (e eosinófilos) das células, como o citoplasma e hemoglobina.²⁸

A posteriori, as lâminas coradas e secas são observadas ao microscópio, com a objetiva de 10x para verificar a qualidade do esfregaço e coloração e selecionar a zona representativa. De seguida, com a objetiva de 40x para verificar a distribuição celular e por último, com a objetiva de 100x, com utilização de óleo de imersão para a contagem e avaliação de anomalias morfológicas. Como complemento, o ESP nos índices eritrocitários pode revelar variações de

tamanho (anisocitose) e na forma (poiquilocitose) das células (Figura 8). Como mencionado anteriormente, a anisocitose está correlacionada com os aumentos do RDW. Por outro lado, a poiquilocitose sugere um defeito na maturação dos precursores dos glóbulos vermelhos na medula óssea ou uma fragmentação destes na circulação.

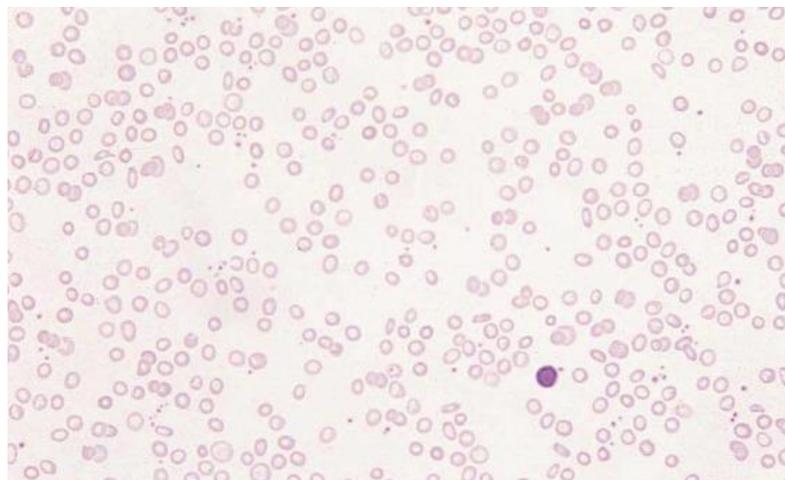


Figura 8 - Presença de anisocitose e poiquilocitose no ESP. [24]

Também se pode observar policromasia que indica a presença de reticulócitos que saíram prematuramente da medula óssea devido a uma estimulação da eritropoietina ou devido a alguma alteração das células em virtude da presença de células malignas. Por último, a presença de inclusões nos glóbulos vermelhos também fornece informações sobre um possível diagnóstico.²⁷



Figura 9 - Presença de neutrófilo em banda, linfócitos, eosinófilos e eosinófilos no ESP. [24]

Em relação aos leucócitos a análise morfológica do ESP fornece informações sobre os aspetos qualitativos e quantitativos dos diferentes leucócitos e permite detetar a eventual presença de células anormais, devido à distensão do sangue periférico, mostrando por exemplo, leucocitose com vários estádios da granulocitopoese (Figura 9).²²

5.3.4. Velocidade de Sedimentação Eritrocitária

A Velocidade de Sedimentação Eritrocitária (VSE) pode ter alguma utilidade no rastreio e monitorização de processos inflamatórios, como lúpus eritematoso sistémico ou artrite reumatoide. Também é utilizada no controlo e diagnóstico de infeções, como pneumonia ou pielonefrite. É influenciada pelas proteínas da resposta de fase aguda e pela anemia que pode estar presente na doença inflamatória. No entanto, devido à sua baixa especificação, muitos clínicos optam pela determinação da Proteína C-Reativa, que é altamente específica.²²

A VSE depende do número de glóbulos vermelhos e da concentração plasmática das grandes moléculas proteicas, como o fibrinogénio e imunoglobulinas. No entanto, a amostra não deve estar coagulada, pois assim não ocorre uma leitura correta da amostra. Por outro lado, se a concentração de anticoagulante for superior ao recomendado, a VSE diminui e pelo contrário se for utilizada heparina como anticoagulante a VSE tende a aumentar. Confirma-se também que a VSE também aumenta em doenças inflamatórias sistémicas, doenças neoplásicas (mieloma múltiplo) e gravidez, sendo útil para o diagnóstico e controlo. O aumento da VSE também se relaciona com a formação do fenómeno de *rouleaux* de eritrócitos.^{22, 23}

O método de referência aceite pelo ICSH é a metodologia de Westergren. Os tubos de sedimentação *in vitro* são colocados na vertical, no suporte próprio, a medição é feita em 60 minutos e os resultados correspondem à distância percorrida pelos glóbulos vermelhos ao fim desse tempo. Portanto, o valor obtido é a medição da distância da parte côncava do plasma e o limite superior da coluna de glóbulos vermelhos, pelo sensor ótico-eletrónico sendo expresso em mm/hora.^{29, 30}

Na Synlab Alentejo, a VSE é determinada pelo analisador automático VES-MATIC CUBE 80, o qual utiliza o Método de Referência de Westergren, segundo as recomendações da ICSH (Figura 10). São utilizados tubos de sangue total contendo anticoagulante EDTA-K3, os mesmos tubos para realização do hemograma e são colocados em agitação antes de serem introduzidas no aparelho. O analisador, de acordo com o método de referência, dispõe de três fases, a agregação dos eritrócitos com formação do fenómeno de *rouleaux*, sedimentação e empacotamento, sendo que não existe consumo de amostra ou transferência de sangue do tubo primário para qualquer parte do analisador. Os resultados



Figura 10 - Analisador automático VES-MATIC CUBE 80. [31]

são expressos em mm/h, nos homens são <10 mm/h e nas mulheres são <15mm/h, embora a VSE tenda a aumentar consoante a idade.

5.3.5. Homeostase

A hemácia é uma estrutura complexa, que contém várias proteínas de superfície que estão ancoradas na sua membrana, à qual cruzam a bicamada lipídica uma ou mais vezes ou são adsorvidas na superfície das hemácias.²¹

O sangue circula pelos vasos sanguíneos sem plaquetas ou ativação de coagulação, ou sangramento considerável. No entanto, quando há uma ruptura de um vaso sanguíneo, desencadeia-se o processo hemostático, no qual as plaquetas aderem ao endotélio danificado. Simultaneamente, os fatores de coagulação (plasma) são ativados por diferentes mecanismos e ocorre a coagulação, cujo objetivo é interromper o derrame sanguíneo. Esta resposta necessita de ser estritamente controlada para evitar o desenvolvimento de coágulos extensos e desta maneira, o sistema hemostático é um equilíbrio entre mecanismos pró-coagulantes (adesão e agregação plaquetária e formação de coágulo de fibrina) e anticoagulantes (inibidores naturais da coagulação e da fibrinólise).^{4, 22 e 27}

O processo de hemóstase apresenta três etapas, entre elas a hemóstase primária, hemóstase secundária ou coagulação e por último a fibrinólise. Os principais componentes do sistema hemostático, os quais atuam em conjunto são as plaquetas e outros elementos formadores de sangue, como monócitos e eritrócitos, as proteínas plasmáticas (fatores de coagulação), elementos fibrinolíticos e inibitórios e por último a parede vascular.²⁷

A hemóstase primária é desencadeada pela lesão vascular, ocorrendo a imobilização das plaquetas no local da lesão que requer interações específicas da plaqueta-parede vascular e plaqueta-plaqueta, ou seja, adesão e agregação, através da ação do Fator von Willebrand (VWF). Para além disso, o VWF é sintetizado nos megacariócitos e transporta o fator VIII da coagulação. As plaquetas contêm glicoproteínas de superfície que são importantes nas reações de adesão e agregação de plaquetas. A exposição do colagénio das células endoteliais, leva a adesão de plaquetas ao subendotélio através da ligação da glicoproteína Ib (GPIb) com o VWF, propiciando a ativação plaquetária, que por sua vez leva a um aumento de moléculas de glicoproteínas IIb/IIIa, permitindo a ligação cruzada da plaqueta ao VWF e, conseqüentemente, agregação plaquetária. Como as plaquetas possuem diversos tipos de grânulos de armazenamento, após a ativação e agregação plaquetária há libertação desses grânulos, que ativam a prostaglandina, e levam à formação de difosfato de adenosina (ADP) e Tromboxano A₂ (TXA₂) que é importante para a formação de um trombo estável, sendo um potente vasoconstritor. Posteriormente, os fosfolípidos da membrana ficam expostos, ficando disponíveis para a ativação da cascata de coagulação.²³

Por outro lado, a hemóstase secundária ou a coagulação envolve os fatores de coagulação e a produção de trombina para a conversão de fibrinogénio num coágulo de fibrina solúvel. As proteínas de coagulação ou os fatores de coagulação, são produzidas na sua maioria no fígado e circulam, normalmente, inativas no plasma. No entanto, a coagulação do sangue envolve um

sistema de amplificação biológica, no qual uma série de reações de proteínas de coagulação, ativam em sequência, por proteólise, uma cascata de proteínas precursoras circulantes. Inicialmente, há ativação em simultâneo de duas vias de coagulação, a via extrínseca e a via intrínseca, que culminam numa via comum. A via extrínseca inicia-se pelo fator tecidual (TF) que está ligado à membrana e que é exposto e ativo após a lesão vascular, ligando-se posteriormente ao fator VII plasmático. O complexo VII-TF ativa o fator IX e o fator X, mas esta via é inativada pelo inibidor da via do fator tecidual (TFPI). A via intrínseca, através do quiminogénio de alto peso molecular (HMWK), faz a ativação do fator do fator IXa e VIIIa na superfície do fosfolípido e na presença de Ca^{2+} ativa o fator Xa. Ambas as vias de coagulação interseam na via comum, no fator Xa, que em combinação com o fator Va formam o complexo protrombina (II), convertendo-se a trombina (IIa), que por sua vez leva à conversão do fibrinogénio no coágulo de fibrina. Na Figura 11 está representado um esquema da cascata de coagulação.^{23, 27}

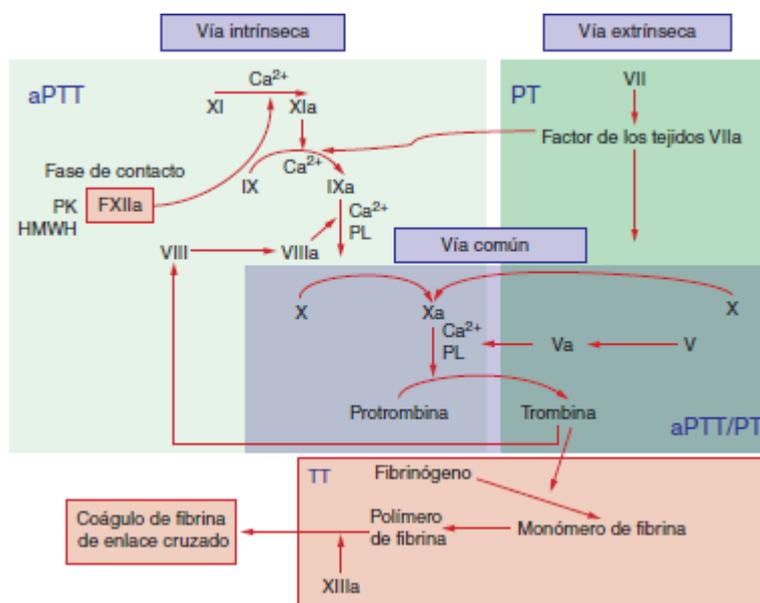


Figura 11 - Cascata da coagulação, esquetizando a via intrínseca, extrínseca e comum. [17]

Por fim, a fibrinólise corresponde à destruição ou lise do coágulo de fibrina e manutenção da permeabilidade do vaso. Há libertação do ativador tecidual do plasminogénio (TPA) das células endoteliais, uma serina-protease que se liga à fibrina e tem a capacidade de converter o plasminogénio que está ligado ao trombo em plasmina. Desta forma, a plasmina degrada o coágulo de fibrina.²³



Figura 12 - Analisador automático CA-620 da Sysmex. [25]

Na Synlab Alentejo, para o estudo da coagulação é realizado as análises do TP com o cálculo da taxa de protombina e do INR, do aPTT e o doseamento quantitativo da concentração do Fibrinogénio pelo aparelho automático CA-620 da Sysmex (Figura 12).

Estas análises medem a atividade de vias da coagulação ou fatores individuais, mas também são utilizadas para monitorizar a ação de anticoagulantes heparina e varfarina. A amostra biológica utilizada nas provas de coagulação é o plasma, colhido num tubo com citrato de sódio 3,8%, isto é, uma parte de citrato para nove partes de sangue. O citrato inativa a coagulação através da ação do quelante de cálcio. Portanto, o analisador automático aquando a realização dos respetivos testes, administra cálcio potenciando a cascata de coagulação e assim mensuram o tempo necessário para formar o coágulo.²⁷

a) Tempo de Protrombina

O TP permite a avaliação da formação de trombina e fibrina através da via extrínseca e comum, isto é, avalia os fatores VII, X, V, II e fibrinogénio. Um valor anormal do TP pode significar alguma doença hepática ou uma deficiência de vitamina K. No entanto, a análise de TP é mais utilizada para a monitorização do tratamento com anticoagulante oral.²⁷

O analisador automático realiza a determinação deste parâmetro através da medição do tempo de formação do coágulo de fibrina após a adição de tromboplastina, uma mistura de fosfolípidos e FT, sendo utilizado o reagente Thromborel-S, que quantifica o tempo de coagulação para a formação do coágulo de fibrina após injeção de cálcio no plasma citrato.

O resultado do teste pode ser mencionado em segundos ou em percentagem, como taxa de protrombina ou pelo cálculo do INR. O TP é calculado entre o tempo de reação da amostra e o tempo de reação do plasma normal (controlo), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de Protrombina} = \frac{\text{Tempo de reação da amostra (s)}}{\text{Tempo de reação do plasma controlo (s)}}$$

Devido à grande variabilidade na sensibilidade das diferentes tromboplastinas, foi necessário padronizar o controle do tratamento com anticoagulantes orais. Para tal, a Organização Mundial da Saúde (OMS) implementou uma padronização do controlo dos anticoagulantes

orais por meio do uso de tromboplastinas de referência, utilizando dois parâmetros que permitem a uniformização dos resultados obtidos e a monitorização da terapia com anticoagulantes. O Índice Internacional de Sensibilidade (ISI) expressa a sensibilidade do reagente de tromboplastina e o instrumento utilizado pelo fornecedor. Por outro lado, o INR é a escala universal que expressa o resultado do TP e que permite corrigir a variabilidade dos resultados obtidos.^{22, 27}

Este parâmetro é calculado através da relação entre o TP do utente e a média dos resultados obtidos de TP pelo laboratório, de acordo com a seguinte formula:

$$INR = \left(\frac{TP \text{ da amostra (s)}}{Tempo \text{ médio de TP (s)}} \right)^{ISI}$$

Como mencionado anteriormente, esta análise é realizada para o controlo e monitorização de doentes que estão sujeitos ao tratamento de anticoagulantes orais derivados de cumarínicos, em linguagem mais comum, uso de varfarina. Este fármaco, sendo um antagonista da vitamina K, vai inibir os fatores de vitamina K dependentes, sendo estes a protrombina, VII, IX, X, proteína C e proteína S e assim controla a formação de coágulos sanguíneos. A dose para os utentes é ajustada com o INR entre 2 e 3, mas quando existem valores inferiores a 2 significa que o sangue está mais espesso e existe tendência para originar coágulos. Por outro lado, valores superiores a 3 indicam que o sangue está bastante líquido e pode originar hemorragias espontâneas. É necessário assim que haja um controlo e ter em conta diversos fatores como clínicos, dietéticos, genéticos e medicação simultânea.^{4, 27}

b) Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

O aPTT representa a integridade geral da via intrínseca e da via comum da coagulação, avaliando os fatores VIII, IX, XI, XII, X, V, II e fibrinogénio sendo que a sua sensibilidade diz respeito a defeitos nos fatores VIII e IX, uma vez que estão associados a distúrbios da coagulação. A avaliação desta análise faz o diagnóstico das perturbações de coagulação e na monitorização da terapia de utentes com propensão para hemorragias ou trombozes.²²

O analisador automático realiza a determinação deste parâmetro através da incubação da amostra de plasma com uma quantidade previamente estabelecida de fosfolípidos que vai atuar como substituto das plaquetas nas vias de coagulação e um ativador superficial que vai induzir a ativação dos fatores do sistema de coagulação da via intrínseca. São também adicionados íões de cálcio que permitem o desenrolar do processo de coagulação, medindo o tempo decorrido até à formação do coágulo de fibrina.

A composição fosfolipídica dos reagentes aPTT é variável, influenciando a sensibilidade de cada reagente à deficiência do fator de coagulação e também a inibidores como heparina e anticoagulantes lúpicos. Nos utentes sujeitos a uma anticoagulação oral é de esperar, igualmente, um prolongamento do aPTT, uma vez que, nestes utentes, os fatores II, VII, IX e X estão diminuídos.²⁷

c) Fibrinogénio

O fibrinogénio ou o fator I, é uma proteína de fase aguda positiva que funciona como fator de coagulação, o qual se agrega e quando é clivado pela trombina forma uma rede fibrosa, a fibrina. Os locais de ligação da fibrina são as plaquetas e os glóbulos vermelhos que permitem a retração do coágulo e do plasma para expulsar o coágulo. O fibrinogénio é uma proteína solúvel que pela ação da trombina é convertida num polímero insolúvel, resultando assim um coágulo de fibrina.⁴

A maioria das proteínas constituintes do plasma são designadas como proteínas plasmáticas. O soro apresenta menos viscosidade e a concentração de proteína total é cerca de 5% menor, devido à perda de fibrinogénio durante a coagulação do plasma de modo a formar o soro. Portanto, concentrações plasmáticas elevadas do fibrinogénio, estão associadas ao aumento de risco de doenças cardiovasculares, assim como o aumento da tendência de trombose.⁴

O analisador automático realiza o doseamento do fibrinogénio utilizando um processo quantitativo, o método de Clauss. Este método assenta na medição do tempo de coagulação da amostra do plasma diluído após a adição do reagente de trombina. Por outras palavras, este método indica que o tempo de coagulação é inversamente proporcional à concentração do fibrinogénio no plasma e o resultado obtido é comparado com o tempo de coagulação de um determinado controlo.

Pode existir aumento do fibrinogénio após operações, traumas, enfarte cardíaco e infeções, sendo por norma um aumento transitório. Por outro lado, pode também ser detetado o seu aumento de duração prolongada em casos de neoplasias e doenças inflamatórias crónicas. Com o aumento da idade, também são observados níveis de fibrinogénio ligeiramente crescentes.²⁶

Em anexo estão disponibilizados os valores de referência do TP, aPTT e fibrinogénio seguidos na Synlab Alentejo (Anexo II).

5.3.6. Estudo de hemoglobinopatias

A Hb é uma hemoproteína, de forma globular que transporta oxigénio dos eritrócitos. A porção heme é um quelato que contém ferro que engloba a porção de globina, sendo esta constituída por dois pares de cadeias polipeptídicas α e dois pares de cadeias polipeptídicas β .⁴

Os genes que codificam as cadeias globinas α e β estão localizados nos cromossomas 16 e 11 e no aglomerado (*cluster*) α encontram-se três genes funcionais, $\alpha 1$, $\alpha 2$ e ζ . Por outro lado, no aglomerado (*cluster*) β encontram-se cinco genes funcionais, β , δ , $A\gamma$, $G\gamma$, e ϵ .²³

Durante o desenvolvimento, a expressão destes genes varia e a combinação das cadeias de globinas sintetizadas independentemente estimulam o aparecimento de diferentes tipos de hemoglobinas, isto é, diferentes genes são suprimidos ou ativados. No período embrionário, prevalecem quatro hemoglobinas de fase transitória na circulação, sendo estas a Hb Gower 1 ($\zeta 2\epsilon 2$), Hb Gower 2 ($\alpha 2\epsilon 2$), Hb Portland ($\zeta 2\gamma 2$). As hemoglobinas menores contêm cadeias de globina γ , a HbF ou δ (Hb A_2). No entanto, a HbF é predominante na vida fetal e tem maior quantidade na circulação do recém-nascido, cerca de 60-90%. Pelo contrário, a HbA é predominante nos adultos e crianças, isto é, superior a 95%. As quantidades de HbA, HbA₂ e HbF nos adultos são atingidas entre os seis e os doze meses de idade. Na Tabela 5 estão representadas as hemoglobinas normais no sangue adulto com as respetivas quantidades.³²

Tabela 5 - Hemoglobinas predominantes no adulto e a respetiva percentagem.

Hemoglobinas	Estrutura	Percentagem (%)
HbA	$\alpha 2\beta 2$	96-98
HbF	$\alpha 2\gamma 2$	0,5-0,8
HbA ₂	$\alpha 2 \delta 2$	1,5-3,2

As anormalidades da hemoglobina podem resultar de defeitos genéticos, nomeadamente, distúrbios estruturais, como a anemia das células falciformes, que é clinicamente mais importante e nos quais é produzida uma hemoglobina anormal, avaliada qualitativamente. Por outro lado, também pode resultar de uma diminuição na síntese de cadeias α e β , designadas por talassemias, existindo um défice parcial ou total de uma ou mais cadeias de globina sendo avaliada quantitativamente.⁴

Para o estudo das hemoglobinas, na Synlab Alentejo, é efetuado a eletroforese de hemoglobinas a pH alcalino e o teste da solubilidade da hemoglobina S (HbS).

a) Eletroforese de hemoglobinas

Muitas variantes das hemoglobinas são hematologicamente e clinicamente silenciosas porque a mutação em causa não faz nenhuma alteração na função, solubilidade ou estabilidade da molécula de Hb. Por outro lado, algumas variantes estruturais estão associadas a fenótipos homozigóticos ou heterozigóticos, ocorrendo assim alterações na solubilidade da hemoglobina, estabilidade ou propriedades de ligação ao oxigênio. Desta forma, é efetuada a eletroforese para detetar as alterações e tem interesse para o diagnóstico de hemoglobinopatias, uma vez que permite quantificar e identificar as diferentes hemoglobinas no sangue periférico.³² No laboratório, esta técnica baseia-se no mesmo princípio da eletroforese de proteínas, descrita no ponto 5.1.3.

A eletroforese de hemoglobinas destina-se à separação das hemoglobinas normais, HbA e HbA₂, e à separação das principais variantes anómalas, a S e C através de eletroforese em gel de agarose no aparelho semiautomático. Esta técnica é realizada em meio alcalino e a Hb encontra-se carregada negativamente e migra do cátodo (polo positivo) para o ânodo (polo negativo).²⁸

Na Synlab Alentejo, a eletroforese de hemoglobinas é efetuada pelo aparelho HYDRASYS da SEBIA, através de uma amostra de sangue total colhido no tubo de EDTA. No entanto, para o diagnóstico é necessário que se proceda à preparação do hemolisado.²² Para a preparação do hemolisado, a amostra de sangue total é centrifugada a 3000 rpm durante cinco minutos para obtenção do aglomerado de glóbulos vermelhos e o sobrenadante que contém leucócitos, plasma e plaquetas é descartado. De seguida, processa-se por duas vezes a lavagem dos glóbulos vermelhos com soro fisiológico às mesmas rotações e minutos. Após a lavagem, efetua-se a lise dos glóbulos vermelhos com a solução hemolisante, agita-se no vórtex e depois, cerca de 10µl da solução são colocadas nos respetivos pentes e coloca-se este no aparelho para realizar a eletroforese a pH 8,5. O aparelho realiza a aplicação da amostra, migração eletroforética, secagem, coloração, descoloração e secagem final. A leitura do gel por densitometria permite o doseamento das hemoglobinas.

b) Pesquisa de Hemoglobina S

O estado homozigótico HbS é conhecido como Anemia das Células falciformes ou doença das células falciformes devido à presença das células em forma de foice no sangue periférico.⁴

A degranocitose é uma hemoglobinopatia que ocorre devido a uma mutação no gene para a β globina, sendo a HbS predominante em circulação, em vez da HbA. O estado heterozigótico,

que corresponde ao traço drepanócito, é assintomático. Na HbS é rara a ocorrência de drepanócitos de formação espontânea, mas esta consegue polimerizar em condições de baixa pressão parcial de oxigénio e assim, a indução *in vivo* da formação das células falciformes por anaerobiose é um dos elementos chave para o diagnóstico laboratorial.²²

A HbS, ao contrário de outras hemoglobinas, é insolúvel em tampão de fosfato concentrado quando é desoxigenada e produz uma turvação visível, alterando a forma dos eritrócitos para uma foice. No teste de solubilidade ou falciformação, através de uma amostra de sangue total colhido num tubo com EDTA, adiciona-se a saponina que vai lisar os glóbulos vermelhos, libertando a Hb. Também se adiciona uma substância redutora, o ditionito de sódio que serve para desoxigenar a Hb, isto é, vai converter o ferro ferroso a ferro férrico, sendo incapaz de se ligar ao oxigénio (Figura 13).^{4, 20}

Este teste é útil para auxiliar na identificação da banda eletroforética anormal, HbS e para identificar o traço falciforme nas unidades de hemácias antes de uma transfusão.²⁰

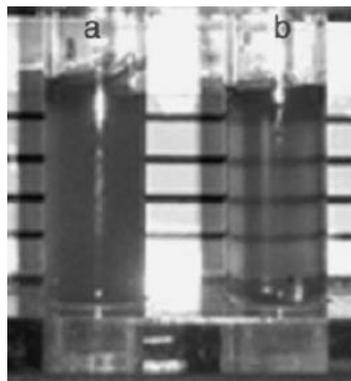


Figura 13 - Teste de solubilidade da HbS. No tubo a, observa-se a formação de turvação, indicativo da presença de HbS. No tubo b a solução é límpida, visualizando-se os traços, indicativo de um resultado negativo. [20]

5.3.7. Caso Clínico de Hematologia

Um utente do sexo feminino, com 37 anos apresentou-se para a realização de análises no dia 2 de julho de 2021 e no dia 16 de julho de 2021. Os resultados do hemograma de ambos os dias estão representados na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores do hemograma da utente.

Parâmetros Analíticos	Resultados dia 2/07/2021	Resultados dia 16/07/2021	Valores de Referência
Eritrócitos	4,66 $\times 10^{12}/L$	4,23 $\times 10^{12}/L$	4,0-5,20 $\times 10^{12}/L$
Hb	13,6 g/dL	12,5 g/dL	12,0-16,0 g/dL
Ht	39,2%	36,5%	36,0-46,0%
VGM	84 fL	86 fL	80-100 fL
HGM	29 pg	30 pg	26-34 pg
CHGM	35 g/dL	34 g/dL	32-36 g/dL
RDW	12,2%	12,5%	11,6-14,0%
Leucócitos	8,27	12,71 $\times 10^9/L$	4,00-10,0 $\times 10^9/L$
Neutrófilos	5,09%	8,26%	1,8-7,0%
Eosinófilos	0,13%	0,14%	<0,5%
Basófilos	0,03%	0,03%	<0,1%
Linfócitos	2,41%	3,69%	1,0-4,0%
Monócitos	0,60%	0,60%	0,2-1,0%
Plaquetas	14 $\times 10^9/L$	92 $\times 10^9/L$	150-400 $\times 10^9/L$
VPM	10,2 fL	10,1 fL	8,5-12,8 fL
PCT	0,07 %	0,09%	0,17-0,38%

Através da análise dos resultados do hemograma do dia 2/7/2021 é sugestivo que a utente está com Trombocitopenia grave, uma vez que a contagem de plaquetas está muito abaixo dos valores de referência.

A trombocitopenia é designada como a função anormal das plaquetas, isto é, há uma insuficiência na produção de plaquetas, sendo a causa mais comum ou por aumento de destruição de plaquetas, nomeadamente por doença autoimune. Também pode estar relacionada com a indução de fármacos.

Pela história clínica e hemograma realiza-se um diagnóstico das causas de trombocitopenia. No caso apresentado, verificou-se que a utente já tinha história clínica e que apresentava esporadicamente valores de plaquetas relativamente baixos. Assim, pode-se deduzir que a utente tem púrpura trombocitopénica crónica, que geralmente é idiopática, e que tem maior incidência nas mulheres entre os 15 e os 50 anos de idade. Este diagnóstico é a causa mais comum de trombocitopenia sem apresentar anemia ou neutropenia, como se verifica nos resultados apresentados de ambos os dias. Os autoanticorpos antiplaquetas, em geral os IgG, propiciam a remoção prematura das plaquetas da circulação pelos macrófagos do sistema reticuloendotelial, nomeadamente no baço.

No diagnóstico da púrpura trombocitopénica idiopática crónica, verifica-se que a contagem de plaquetas está bastante inferior ao valor de referência, com um valor de Hb e leucograma normais. Neste caso, verifica-se que a utente, tem todos os resultados dentro dos valores de referência, com exceção da contagem de plaquetas. A utente foi induzida ao tratamento para que a contagem de plaquetas fique acima do nível em que pode ocorrer sangramento espontâneo.

No dia 16 de julho de 2021 verificou-se que após o tratamento, a contagem de plaquetas subiu ligeiramente, mas o valor de PCT e plaquetas continua relativamente baixo, e assim a utente necessita de continuar a ser vigiada.

5.4. MICROBIOLOGIA

A microbiologia [do grego: *mikros* (“pequeno”), *bios* (“vida”) e *logos* (“ciência”)] é o estudo dos organismos microscópicos e de suas atividades, nomeadamente a forma, a estrutura, a reprodução, a fisiologia, o metabolismo e a identificação dos microrganismos. Os microrganismos são formas de vida diminuta para serem vistas a olho nu, classificando-se como procariontes, que compreendem as bactérias ou como eucariontes que compreendem os fungos (leveduras e fungos filamentosos), protozoários e algas. Por outro lado, os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios.³³

Na secção de microbiologia da Synlab Alentejo, as amostras biológicas mais comuns são as urinas asséticas, expetoração, exsudados, principalmente os vaginais, e as fezes para coprocultura ou exame parasitológico. Na rotina laboratorial diária é efetuada a receção da amostra que é triada posteriormente, verificando se cada amostra vai ao encontro das condições necessárias para um correto processamento desta, isto é, averiguar se a amostra possui o volume suficiente para a análise que solicita ou se se encontra em recipientes corretos para a sua conservação e procedimento. Após a verificação e triagem, segue-se a quantificação e identificação das amostras nos respetivos aparelhos ou técnicas de acordo com os parâmetros solicitados.

Na secção de microbiologia, cada amostra tem uma ordem de procedimentos, ou seja, é realizado o exame direto da amostra através do microscópio, de seguida realiza-se o exame cultural, semeando a amostra nos meios de cultura considerados mais adequados ao seu crescimento microbiológico. Posteriormente, com a obtenção da cultura pura procede-se à identificação definitiva dos microrganismos e determinação da sua suscetibilidade ou resistência aos antimicrobianos. Por fim, o resultado é comunicado ao clínico de modo a que

o tratamento mais apropriado seja iniciado ou ajustado. Para além disso, também se realizam testes rápidos para pesquisa de sangue oculto nas fezes e diagnóstico imunológico da gravidez, baseados em técnicas imunocromatográficas.

5.4.1. Colorações

As bactérias são organismos unicelulares pequenos e versáteis, que podem ser encontrados de forma isolada ou em colónias. São constituídas por uma parede celular, contendo uma camada peptidoglicano que contém um dissacarídeo ligado por polipeptídeos com dois açúcares, o N-acetilglucosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM). A parede celular protege a célula das alterações mecânicas e fornece uma barreira contra certos agentes químicos.^{34, 35}

A coloração de lâminas para observação microscópica direta é uma das formas iniciais para a diferenciação bacteriana. Consoante a capacidade de reter os corantes, identifica-se os organismos e os componentes celulares específicos do microrganismo que está presente na amostra, incluindo o tamanho, forma e agrupamento dos organismos (cocos, bacilos, estafilococo, etc.).³⁵

Existe uma grande variedade de técnicas que podem ser utilizadas, consoante o microrganismo que se quer identificar, isto é, a partir da observação microscópica obtém-se uma identificação presuntiva do agente patogénico, orientando a observação macroscópica das colónias em cultura e por fim, determina-se são ou não precisos testes complementares.

a) Coloração de Gram

A coloração de Gram é uma técnica de coloração rápida e fácil, sendo das mais utilizadas em laboratório clínico, uma vez que a capacidade diferencial permite a identificação de uma variedade de microrganismos. Assim, esta coloração permite a identificação e diferenciação das bactérias consoante as características físicas e químicas das paredes celulares, uma vez que as diferenças na composição da parede celular de cada bactéria são o fator responsável da reação à coloração, isto é, podem ser bactérias de Gram-negativo (GN) ou de Gram-positivo (GP).^{35, 36}

Inicialmente, as lâminas, devidamente identificadas e preparadas são fixadas com metanol e após secagem é adicionada a solução de cristal de violeta, corante primário que penetra nas células bacterianas e corando-as de roxo. De seguida, há adição da solução de lugol, o mordente que permite um complexo com o corante primário. Na etapa da descoloração é

aplicada a solução de álcool-acetona, que vai remover o corante das bactérias de GN. Nesta fase, as bactérias com a camada do peptidoglicano espessa, contendo o ácido teicoico e ácidos lipoteicoicos retêm o complexo cristal violeta-lugol e são denominadas como bactérias de GP. Por outro lado, as bactérias de GN como tem uma camada fina de peptidoglicano e uma membrana externa que contém lipopolissacarídeo, fosfolípídeos e proteínas não conseguem reter o complexo. No final, é adicionada às lâminas a solução de safranina básica, um corante secundário que cora as bactérias de GN com a tonalidade vermelha ou rosa.³⁵

b) Coloração de Ziehl-Neelsen modificada

A coloração de Ziehl-Neelsen modificada é uma técnica de coloração diferencial para a identificação de bactérias ácido-álcool resistentes, particularmente *Mycobacterium* spp. Estas bactérias contêm ácidos micólicos nas paredes celulares e são desprovidas de peptidoglicano, o que lhes confere uma resistência ácido-álcool devido à escassa permeabilidade da parede.³⁵

Na Synlab Alentejo é utilizado um *kit* de coloração que tem como base a metodologia de Ziehl-Neelsen modificada. As lâminas, devidamente identificadas, preparadas, e fixadas com metanol, são imersas numa solução de carbolfucsina durante 5 minutos. O fenol contido na solução dissolve a camada lipídica e permite a penetração do corante nas células. Após a lavagem com água corrente, as lâminas são imersas numa solução de azul de metileno, que é um agente de contraste, isto é, os microrganismos ficam vermelhos contra um fundo azul.³⁶

5.4.2. Meios de Cultura

A identificação e propagação *in vitro* do agente infeccioso é geralmente o método mais sensível e específico de diagnóstico e para tal, para a seleção de quais os meios de cultura que se semeiam, o tipo de amostra é um fator decisivo. No entanto, o sucesso deste método depende da biologia do microrganismo, do local da infeção, da qualidade dos meios e da resposta imune do utente à infeção.

Os meios de cultura são classificados como meios seletivos, meios diferenciais, meios de enriquecimento e meios não seletivos. Os meios seletivos são utilizados para impedir o crescimento de bactérias indesejadas e potenciar o crescimento de microrganismos patogénicos específicos, pois geralmente contêm pigmentos, aditivos químicos ou antimicrobianos em concentrações destinadas a inibir a microbiota contaminante, mas não o patógeno suspeito. Os meios diferenciais permitem a diferenciação das colónias do microrganismo específicos em relação a outras colónias que crescem em simultâneo, por exemplo através da adição lactose para detetar organismos fermentadores de lactose. Os

meios de enriquecimento permite enriquecer uma cultura, normalmente, através de meio líquido, fornecendo nutrientes e condições ambientais para o crescimento de microrganismos fastiosos e não fastidiosos. Por último, os meios não seletivos permitem o crescimento da maioria dos microrganismos, sem necessidades específicas de crescimento.^{33, 34}

Na Synlab Alentejo são utilizados diferentes meios, tendo em conta o produto biológico cedido e o tipo de análise que é solicitada. Na Tabela 7 estão representados os produtos biológicos e a indicação dos meios a inocular para o exame cultural no respetivo laboratório. Em Anexo III encontram-se descritos detalhadamente os meios de cultura.

Tabela 7 - Meios de cultura para os respetivos produtos biológicos.

Produto Biológico	Meios para Exame Cultural
Urina	CLED
Exsudado vaginal	COS, SGC, STRB, Todd H-T
Exsudado uretral	COS, HAE2, PVX, SGC, STRB, Todd H-T
Exsudado Anal/ Retal	COS, PVX (quando solicitado), STRB, Todd H-T
Exsudado faríngeo	COS, PVX (quando solicitado), SGC, BHI-T
Exsudado nasal	COS, HAE2, SGC, BHI-T
Exsudado auricular	CLED, COS, HAE2, SGC, BHI-T
Esperma	COS, PVX, SGC, STRB
Expetoração	COS, HAE2, SGC
Pús	CLED, COS, HAE2, PVX (quando solicitado), SGC, BHI-T
Fezes	SGC, SALM, XLD, MSA2, MCK, CAM, Selenito F-T

Adiante será mencionado o processamento microbiológico das amostras mais comuns realizadas no laboratório da Synlab Alentejo, na secção da microbiologia.

5.4.3. Testes de Identificação de Microrganismos

Os testes de identificação, neste caso designados como testes bioquímicos, auxiliam na identificação de grupos ou espécies de bactérias ou leveduras, uma vez que as atividades enzimáticas são amplamente utilizadas para diferenciar as bactérias, através da verificação das transformações químicas, que ocorrem num determinado substrato pela ação das enzimas. Neste contexto, estes testes proporcionam uma identificação presuntiva do microrganismo em estudo, pois este possui um sistema enzimático específico que vai permitir orientar a marcha analítica das amostras biológicas, ou seja, auxilia na identificação definitiva através da eleição das cartas de identificação utilizadas em aparelhos automáticos e suscetibilidade aos antimicrobianos.

De seguida irão ser descritos alguns testes de identificação que são realizados com mais frequência no laboratório da Synlab Alentejo.

a) Teste da Catalase

A presença da catalase é detetada nos microrganismos através da libertação de oxigénio a partir de água oxigenada, uma vez que a enzima catalase catalisa a conversão do peróxido de hidrogénio em água e oxigénio. O teste da catalase é útil na diferenciação presuntiva de estafilococos, em que a catalase é positiva, de estreptococos, em que a catalase é negativa. No laboratório é utilizado o *kit* ID color Catalase (ID-ASE), da Biomérieux, que é constituído por uma agente espessante e um corante. A presença da enzima catalase é detetável pela libertação de oxigénio na forma de bolhas de gás, após a junção de uma colónia do microrganismo ao reagente.^{33, 38}

b) Teste de aglutinação com látex

O teste de aglutinação com látex, também conhecido como teste da coagulase é utilizado para a diferenciação dos estafilococos, isto é, permite distinguir *Staphylococcus aureus* de outros estafilococos menos patogénicos. A enzima coagulase atua como fator plasmático e converte o fibrinogénio no coágulo de fibrina que pode proteger a bactéria da ação fagocítica e isolá-la de outras defesas do hospedeiro. No laboratório é utilizado o reagente PASTOREX™ STAPH-PLUS, da Bio-Rad, que permite a deteção simultânea do fator de afinidade por fibrinogénio, dos polissacáridos capsulares e da proteína A de *S. aureus*, através da utilização de partículas de látex sensibilizadas por fibrinogénio, IgG, e pelos anticorpos monoclonais específicos dos polissacáridos capsulares de *S. aureus*. A reação é positiva, ou seja, indica presença de *S. aureus* quando existe formação de aglutinados, observados a olho nu.^{33, 38}

c) Teste da Oxidase

Todas as bactérias aeróbicas utilizam uma cadeia de transporte de eletrões, mas nem todas as cadeias são idênticas. Algumas bactérias têm presente o citocromo c-oxidase, que é a última enzima que transfere os eletrões ao oxigénio. O teste da oxidase permite detetar o componente C do complexo citocromo-oxidase nas bactérias. Na presença de oxigénio na atmosfera e do citocromo C, a enzima citocromo oxidase oxida o reagente fenilenodiamina, formando um composto colorido violeta, o indofenol. Este teste diferencia a bactéria *Neisseria*, visto que é uma característica desta, pois é citocromo-oxidase positiva. Para além disso, também diferencia algumas bactérias bacilos GN, nomeadamente *Pseudomonas* que é oxidase positiva e *Escherichia* que é oxidase negativa. No laboratório é utilizado o *kit* de Oxidase, da Biomérieux, utilizando o reagente Kovacs juntamente com colónias existentes na cultura. Se existir o aparecimento de uma coloração violeta-púrpura em 10-30 segundos é indicativo de oxidase positiva.^{33, 38}

d) Teste da bacitracina

O teste da bacitracina é utilizado para diferenciar *Streptococcus* do Grupo A de outros grupos de *Streptococcus*. Ao contrário dos estreptococos β -hemolíticos, os *Streptococcus* do Grupo A são geralmente sensíveis à bacitracina. A placa de Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS) é inoculada por inundação a partir de uma suspensão realizada com as colônias da estirpe isolada, e é colocado um disco de bacitracina no centro da placa inoculada. A placa é colocada a incubar na estufa durante 24 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ e depois observa-se o diâmetro do halo à volta do disco. A observação de um halo de inibição superior ou igual a 15 mm significa uma eventual presença de *Streptococcus* do Grupo A.³³

e) Teste da Blastese

O teste da blastese ou a prova de filamentação, é utilizado para a diferenciação de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* de outras espécies do género *Candida*. O objetivo do teste, é ter a capacidade de observar se as leveduras, em condições adequadas, dão origem a uma protuberância cilíndrica que se vai alongar e formar um tubo germinativo. Assim sendo, para a sua realização é necessário colocar no tubo contendo soro, duas ou três colônias e agitar. Este tubo é colocado na estufa a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, durante duas a três horas e posteriormente é observado o resultado ao microscópio ótico.³⁵

f) Teste com optoquina

O teste com optoquina é utilizado para testar a sensibilidade dos estreptococos em relação a esta substância, pois *Streptococcus pneumoniae* é geralmente sensível à optoquina enquanto os estreptococos α -hemolíticos são normalmente resistentes. Para a realização deste teste é utilizada uma placa de gelose de COS, inoculada por inundação do meio, em que é colocado um disco de optoquina. A placa é depois colocada a incubar durante 18-24 horas, a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. A observação de um halo de inibição superior ou igual a 15 mm significa uma eventual presença de *S. pneumoniae*.³⁵

5.4.4. Testes de identificação e sensibilidade aos antibióticos

A secção de microbiologia do laboratório da Synlab Alentejo, encontra-se equipada pelo aparelho VITEK® 2 Compact da Biomérieux (Figura 14). O seguinte aparelho é um analisador automático que proporciona a realização de teste de identificação de microrganismos patogénicos e teste de sensibilidade a antibióticos (AST) através do inóculo preparado manualmente. O VITEK® 2 Compact tem capacidade para realizar as tarefas de inoculação, incubação e leituras de cartas de teste. As cartas de teste são constituídas por múltiplos poços que possuem no seu interior variadas substâncias bioquímicas e-ou antibióticos com diferentes concentrações.⁴⁸



Figura 14 - Analisador automático VITEK® 2 Compact da Biomérieux. [47]

As cartas de identificação ou de suscetibilidade aos antibióticos podem ser realizadas em simultâneo para a mesma amostra. No entanto, antes de serem introduzidas as cartas na cassette e no analisador, é efetuada a preparação de uma suspensão de inóculo para cada amostra. A suspensão é preparada no tubo de ensaio mediante solução salina estéril (NaCl 0,45%) mais as respetivas colónias isoladas da amostra, de modo a obter a turvação requerida. A turvação é medida no aparelho DensiCheck™ (da Biomérieux), variando os intervalos de valores se for para uma bactéria de GN-GP ou para um fungo, por exemplo, mas deve-se encontrar dentro dos valores específicos da escala de McFarland. Para a aplicação do AST, são retirados 145µL no caso de bactérias de GN e 280µL no caso de bactérias de GP da solução anteriormente preparada e verificada com a escala de McFarland para um novo tubo que também contém NaCl 0,45%.

Posteriormente, a cassette contendo as cartas é colocada na estação de enchimento para iniciar o ciclo de enchimento, em que os poços das cartas são inoculados automaticamente através da câmara de vácuo. De seguida, é transferida para a estação de introdução de forma a ocorrer o seu processamento, com leitura do código de barras de cada carta e respetiva cassette. Cada carta é colocada numa posição do carrocel onde ocorre o período de incubação e depois são transportadas para o sistema ótico de 15 em 15 minutos para ser efetuado a monitorização do crescimento e atividade dos microrganismos no interior dos poços. Portanto, o sistema ótico utiliza luz visível que faz a leitura de luz inicial do poço, isto é, antes da fase de crescimento do microrganismo e depois a cada 15 minutos mede a transmissão de luz dos poços, permitindo medir o crescimento do microrganismo pela quantidade de luz que é

impedida de atravessar o poço. No final, quando os testes são concluídos o sistema ejeta as cartas.^{48, 49}

A partir do programa Sistema Especialista Avançado (AES) são analisados os resultados obtidos pelo sistema VITEK 2 relativamente à validade biológica, dados sobre os resultados, nomeadamente, relatar as inconsistências entre a identificação do organismo e a suscetibilidade antimicrobiana do isolado em questão, e também determinado o fenótipo antimicrobiano do isolado com base nos resultados dos testes de suscetibilidade. O analisador dispõe de uma base de dados atualizada que identifica as várias espécies de microrganismos clinicamente revelantes e o programa AES determina o valor da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e atribui, segundo as regras da Conselho Europeu de Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana (EUCAST), a classificação de sensível, intermédio ou resistente em relação à suscetibilidade aos antibióticos.⁵⁰

Nas Tabelas 8 e 9 estão representadas as cartas de identificação e sensibilidade utilizadas no laboratório Synlab Alentejo através do analisador VITEK® 2 Compact da Biomérieux, com a respetiva determinação.

Tabela 8 - Cartas de identificação.

Nome da Carta	Carta de Identificação
GN	Bacilos de GN fermentadores e não-fermentadores da lactose
GP	Bactérias de GP
YST	Fungos leveduriformes

Tabela 9 - Cartas de sensibilidade.

Nome da Carta	Carta de Sensibilidade
AST-N359	Bacilos de GN aeróbios
AST-N355	Bacilos de GN aeróbios (Teste da oxidase negativa)
AST-N373	Bacilos de GN aeróbios (Teste da oxidase positiva)
AST-ST03	Bactérias de GP, nomeadamente <i>Streptococcus</i> beta-hemolíticos e <i>Viridans</i> , <i>S. pneumoniae</i>
AST-P648	Bactérias de GP, nomeadamente de <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp. e <i>S. agalactidae</i> (Testes da catalase e coagulase positivos)
AST-P586	Bactérias de GP, nomeadamente de <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp. e <i>S. agalactidae</i> (Testes da catalase positivo e coagulase negativo)

5.4.5. Análise cito-bacteriológica de urina

A urina normal é estéril, no entanto pode-se tornar contaminada através da presença de microrganismos presentes em qualquer parte do trato renal. Assim sendo, a infecção urinária é uma das doenças infecciosas mais comuns na comunidade. As infecções do sistema urinário podem ser classificadas, consoante a localização da infecção e podem ser sintomáticas ou assintomáticas. Pode ser uma infecção a nível da bexiga, nomeadamente nas vias urinárias baixas, designada como cistite ou uma infecção a nível da uretra, designada como uretrite. Por outro lado, pode ocorrer uma infecção mais grave, em que as infecções no trato urinário inferior podem migrar para os ureteres e rins, causando uma infecção no parênquima renal, designada como pielonefrite. Por último, pode ainda ocorrer uma infecção a nível da próstata, designada como prostatite.³³

É importante realizar o despiste das infecções urinárias, nomeadamente das assintomáticas, uma vez que existem fatores de risco no hospedeiro que facilitam a ocorrência de infecções urinárias, tais como ser mulher, uma vez que a uretra tem dimensões mais pequenas e encontra-se próxima da região perianal, a gravidez, a menopausa, hábitos de higiene inapropriados, idade, utilização de cateteres urinários e a imunossupressão.

A maioria das infecções urinárias são causadas por microrganismos de GN, sendo *E. coli* a mais frequente e principal causadora da infecção, tanto a nível da comunidade como a nível hospitalar. De seguida, as infecções por *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, são também comuns, sendo que a infecção por *Pseudomonas* é das mais problemáticas devido à sua resistência natural a vários antimicrobianos. Por outro lado, as infecções urinárias por microrganismos de GP estão normalmente associadas à *Staphylococcus saprophyticus* e *S. aureus*. A nível dos fungos, temos *Candida* spp que pode provocar infecções urinárias.³³

A urina para a análise da urocultura deve ser recolhida para um recipiente estéril, mas primeiramente deve-se limpar com um toalhete cuidadosamente toda a área genital da frente para trás, de forma a garantir que não haja contaminação da uretra e vagina pela zona perianal, no caso das mulheres. De seguida, deve-se eliminar o primeiro jato e colher o jato intermédio para o contentor assético. Este procedimento pré-analítico é muito importante, uma vez que pode ocorrer contaminação da urina por células ou leucócitos, falseando o resultado.⁵⁰

A análise microbiológica da urina assética no laboratório da Synlab Alentejo inclui o exame microscópico do sedimento urinário, o exame cultural, a identificação do microrganismo e, por fim, a realização de testes de suscetibilidade aos antimicrobianos.

a) Exame microscópio do sedimento urinário

Para o exame a fresco e para o exame direto corado, pela coloração de Gram ou Ziehl-Neelsen modificada, são centrifugados cerca de 10 mL de urina assética, a 1500 rpm, durante 5 minutos. É observado o sedimento urinário ao microscópio, com a objetiva de 40x, de forma semelhante às urinas de tipo II. Neste exame, são especialmente valorizados a contagem de leucócitos e a presença de bacteriúria. A observação ao microscópio, induz uma orientação para o exame cultural.

b) Exame cultural das amostras de urocultura

A urina colhida de forma assética é homogeneizada e semeada através de uma ansa calibrada de 10 µl diretamente em meio CLED (ver Tabela 7), com uma inclinação de 35° em relação ao meio, através do método da sementeira quantitativa. De seguida, é colocada a incubar na estufa, em aerobiose, a uma temperatura de 35 ± 2°C durante 18-24 horas e posteriormente, é observada.

Para o resultado ser considerado positivo é necessário ter em consideração o número de células epiteliais, assim como a leucocitúria e a contagem de unidades formadoras de colónias (UFC). Portanto, um sedimento normal com um crescimento bacteriano inferior a 10³ UFC/mL é considerado um resultado negativo, mas pelo contrário, um sedimento patológico e um crescimento bacteriano superior a 10⁵ UFC/mL é considerado um resultado positivo. No entanto, é possível que exista infeção urinária com bacteriúria inferior e nestes casos é necessária uma avaliação do exame direto corado para verificar se há contaminação. Assim sendo, são consideradas como clinicamente significativas culturas com um microrganismo predominante. Todavia se houver o crescimento de mais do que três microrganismos patogénicos distintos, existe uma elevada probabilidade de o produto biológico estar contaminado e deve-se pedir nova colheita.

c) Identificação e suscetibilidade do antibiograma

Por último, são realizados testes identificativos e respetivo antibiograma da(s) estirpe(s) isoladas e com crescimento significativo no analisador VITEK® 2 Compact.

Se se observar nas placas o crescimento de colónias com morfologia sugestiva de *E. coli*, isto é, presença de colónias amarelas procede-se à realização da identificação e sensibilidade dos antimicrobianos no VITEK® 2 Compact, através das cartas GN e AST-359 (ver Tabelas 8 e 9). Por outro lado, se a morfologia encontrada não for sugestiva de *E. coli*, deve ser realizada a identificação de organismos de GP e de GN através do aspeto macroscópico das colónias, pelo resultado do Gram e posteriormente a realização dos testes de identificação (descritos



Figura 15 - Colónias sugestivas de *Pseudomonas* em meio CLED. Observação realizada Synlab Alentejo.

detalhadamente em 5.4.3), como por exemplo, o teste da oxidase que sugere a presença de *Pseudomonas* (Figura 15), sendo oxidase positiva e assim recorre-se à realização da identificação e sensibilidade dos antimicrobianos no VITEK® 2 Compact, através das cartas GN e AST-373 (ver Tabelas 8 e 9). No caso de bactérias de GP, recorre-se ao teste da catalase e se for positiva realiza-se o teste da coagulase. Consoante o resultado, utilizam-se cartas GP para identificação e P-648, P586 ou ST03 para a sensibilidade dos antimicrobianos no VITEK® 2 Compact.

5.4.6. Análise cito-bacteriológica de exsudados urogenitais

As bactérias, vírus, protozoários e leveduras são microrganismos que podem provocar infeções genitais. Estas infeções podem resultar de desequilíbrios da microbiota, mas também podem ser transmitidas através da via sexual, sendo a principal via, designadas por doenças sexualmente transmissíveis (DST).^{34, 51}

As DST podem-se manifestar por manifestações clínicas agudas, que posteriormente podem desenvolver um quadro clínico crónico e os portadores assintomáticos são os reservatórios da infeção. O aumento de relações sexuais desprotegidas, o aumento de número de parceiros sexuais e o contexto socioeconómico são os principais fatores de risco que induz a transmissão das DST.⁵³

As principais bactérias que causam infeções a nível do trato urogenital são *Neisseria gonorrhoeae*, o agente etiológico da gonorreia, *T. pallidum*, o agente da sífilis, *Chlamydia trachomatis* que provoca clamídia, *Gardnerella vaginalis*, a principal causadora de vaginites e *Mycoplasma genitalium*. No caso das leveduras, a principal levedura envolvida neste tipo de patologias é *C. albicans*, que é a causadora da candidíase e a nível dos parasitas, o principal protozoário é *Trichomonas vaginalis*, o agente etiológico da tricomoníase.⁵³

Os principais produtos biológicos utilizados para o diagnóstico de infecções urogenitais são o exsudado vaginal, exsudado uretral e o exsudado vaginal/anal. A análise dos produtos biológicos do trato urogenital inclui o exame direto a fresco, o exame direto com coloração de Gram e o exame cultural com posterior identificação e realização de antibiograma.

a) Exsudado vaginal e vaginal-anal

A microbiota vaginal é composta por inúmeros microrganismos, sendo que em maior quantidade existe *Lactobacillus* spp, que mantém o pH ácido da região e impedem a proliferação de microrganismos patogênicos, que estão presentes em menor quantidade. Os microrganismos em menor quantidade são os *Streptococcus* do Grupo B, *Enterococcus* spp., *G. vaginalis*, *Mycoplasma*, entre outros, e a sua percentagem é influenciada pelo ciclo menstrual feminino. Portanto, quando existe algum desequilíbrio na microbiota vaginal, isto é, quando existe uma maior proliferação dos microrganismos patogênicos, pode ocorrer o aparecimento de várias patologias, e se não forem tratadas, eventualmente vão progredir para doenças mais graves e também serem transmitidas sexualmente. Na Tabela 10 estão representadas as patologias vaginais com o respectivo microrganismo associado.⁵³

Tabela 10 - Patologias vaginais.

Doença	Infeção	Microrganismo
Vaginite	Infeção Vaginal	<i>C. albicans</i> <i>T. vaginalis</i>
Vaginose ou vulvo-vaginite	Infeção do epitélio vaginal e da glândula de Bartholin (desequilíbrio da flora)	<i>Mobiluncos</i> <i>G. vaginalis</i>
Cervicite	Clamídia (DST) Gonorreia (DST)	<i>C. trachomatis</i> <i>N. gonorrhoeae</i>

O exsudado vaginal/ anal é realizado para o rastreio da infeção por *Streptococcus* β hemolítico do grupo B (*Streptococcus agalactiae*) em grávidas, uma vez que a passagem desta bactéria para o bebé durante o parto natural, isto é, no momento da passagem pelo canal vaginal, pode resultar em graves complicações para o bebé, desde pneumonia, meningite ou sepsis.⁵³

Exame microscópico direto

O exame microscópico do exsudado vaginal é composto pelo exame do esfregaço a fresco e pelo esfregaço corado com coloração de Gram, sendo as lâminas efetuadas no momento da colheita, antes de a zaragatoa ter sido colocada no meio de transporte. No exame direto a fresco, são observadas e semiquantificadas as células epiteliais, os leucócitos e eritrócitos, a presença de leveduras, tricomonas e ovos de *Enterobius* (devido à contaminação perianal). Em

contrapartida, no esfregaço corado com coloração de Gram, é pesquisada ao microscópio ótico, a presença microrganismos de GP e de GN, assim como leveduras e fungos filamentosos. A avaliação qualitativa dos elementos ao microscópio é mencionada como “ausência de elementos”, “raras” – elementos <25% do campo, “alguns” – elementos 25 a 50% do campo ou “muitos” – elementos >50% do campo. Para além disso, a presença de “clue cells” é sugestiva de vaginose bacteriana provocada por *G. vaginalis*.

Exame cultural

A zaragatoa colhida com meio de transporte de carvão é semeada diretamente nos meios de cultura. No exsudado vaginal, os meios de cultura semeados são a gelose COS, STRB, SGC e o meio líquido Todd H-T (Tabela 7), sendo semeado em primeiro lugar o meio de gelose COS e em último lugar a inoculação do meio líquido. Quando solicitado, por exemplo, a pesquisa de *Neisseria* também é semeado o meio gelose PVX. Todas as placas são colocadas a incubar em aerobiose, a uma temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18-24 horas, com exceção da placa de SGC, que é colocada a incubar durante 18-48 horas, a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, em regime de aerobiose. Em relação à placa de PVX, esta é colocada a incubar durante 18-48 horas a uma temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$, numa atmosfera de dióxido de carbono (CO_2) em anaerobiose, utilizando uma saqueta GENbag anaer, da BioMérieux.

Os resultados observados no exame cultural são sempre comparados com as observações realizadas no exame microscópico a fresco e corado. Assim, se existir crescimento na gelose de COS é realizada a valorização clínica com base nas observações do exame direto do esfregaço corado com coloração de Gram, isto é, se forem observados no esfregaço cocos de GN, é realizado o teste da oxidase e se este for positivo, o resultado é reportado como *N. gonorrhoeae*. Por outro lado, se forem observadas bactérias de GP no esfregaço, há realização dos testes de identificação, como o teste catalase, da bacitracina e da coagulase e, posteriormente, conforme os resultados, é realizada a identificação no equipamento VITEK[®] 2 Compact através das cartas GP e das cartas de sensibilidade aos antimicrobianos P648 e P586 (ver Tabelas 8 e 9).

Na placa de SGC se existir crescimento valorizável do ponto vista clínico é realizada a prova de filamentação (descrito detalhadamente em 5.4.3), para a identificação de *C. albicans*. Se a prova de filamentação for negativa ou inconclusiva, é realizada a identificação da levedura no equipamento VITEK[®] 2 Compact, através da carta de identificação YST, pelo contrário, se a prova de filamentação for positiva concede-se a identificação de *C. albicans*.

Na placa de SRTB, apenas é valorizável do ponto de vista clínico o crescimento de colônias com morfologia sugestiva de *Streptococcus* do grupo B de Lancefield. No caso do crescimento não ser valorizável, é realizada a repicagem a partir do meio líquido Todd H-T para o meio de COS, sendo a placa novamente colocada a incubar durante 18-24 horas na estufa em aerobiose, a uma temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Se após incubação a morfologia for sugestiva de *S. agalactiae*, o resultado é reportado e apenas é realizado o teste de sensibilidade aos antimicrobianos se for especificamente solicitado.

Por último, se o meio PVX for solicitado e existir crescimento valorizável nesta placa após o período de incubação, são tidos em conta os resultados do exame microscópico direto com coloração de Gram e é realizado o teste da oxidase, uma vez que se o teste for positivo o resultado é referenciado como *N. gonorrhoeae*.

No que diz respeito ao exsudado vaginal-anal, a zaragatoa colhida com meio de transporte de carvão é semeada diretamente nos meios de cultura, sendo estes a gelose de COS, STRB e o meio líquido Todd H-T (Tabela 7). Os resultados observados no exame cultural não são comparados com o exame microscópio, mas sim pela observação de crescimento bacteriano nas placas, e neste caso se houver crescimento, os passos são iguais ao exsudado vaginal.

b) Exsudado uretral

Exame microscópico direto

O exame microscópico do exsudado uretral é composto pelo exame do esfregaço a fresco e pelo esfregaço corado com coloração de Gram. No exame direto a fresco, são observadas e semiquantificadas as células epiteliais, os leucócitos e eritrócitos, a presença de leveduras e tricomonas. Em contrapartida, no esfregaço corado com coloração de Gram, é pesquisada ao microscópio ótico, a presença de microrganismos de GP e de bactérias GN, assim como leveduras e fungos filamentosos. A avaliação qualitativa dos elementos ao microscópio é mencionada como “ausência”, “raras”, “alguns” ou “muitos”. Para além disso, a presença de “clue cells” é sugestiva de vaginose bacteriana provocada por *G. vaginalis*.

Exame cultural

A zaragatoa colhida é semeada diretamente nos meios de cultura. No exsudado uretral, os meios de cultura semeados são a gelose COS, HAE2, PVX, SGC, STRB, Todd H-T (Tabela 7), sendo semeado em primeiro lugar o meio de gelose COS e em último lugar a inoculação do meio líquido. No caso da mulher, só é semeado o meio PVX quando solicitado pelo clínico, a

coloração de Gram é sugestiva ou colheita é sugestiva. Todas as placas são colocadas a incubar em aerobiose, a uma temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18-24 horas, com exceção da placa de SGC, que é colocada a incubar durante 18-48 horas, a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, em regime de aerobiose. Em relação à placa de PVX, esta é colocada a incubar durante 18-48 horas a uma temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$, numa atmosfera de CO_2 em anaerobiose, utilizando uma saqueta GENbag anaer, da Biomérieux.

Os resultados observados no exame cultural são sempre comparados com as observações realizadas no exame microscópico a fresco e corado. Assim, se existir crescimento na gelose de COS é realizada a valorização clínica com base nas observações do exame direto do esfregaço corado com coloração de Gram, é realizada a identificação no equipamento VITEK® 2 Compact através das cartas (ver Tabelas 8 e 9). Na placa de SGC, SRTB e PVX o procedimento da marcha analítica é igual ao da marcha analítica do exsudado vaginal.

Na placa de HAE2, se existir crescimento valorizável nesta placa após o período de incubação, é sugestivo de *Haemophilus influenzae* ou *Haemophilus parainfluenzae*. Neste caso deve-se realizar o teste de sensibilidade aos antibióticos na galeria ATB™ HAEMO EU (08), da Biomérieux, que é incubado em aerobiose, a uma temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24-48 horas e lido posteriormente.

Micoplasmas urogenitais

Os micoplasmas urogenitais são amplamente distribuídos na natureza e nos humanos colonizam as membranas mucosas, especialmente as genitais. São um conjunto de bactérias encontrados no homem ou na mulher, existindo pelo menos sete espécies diferentes que podem ser isoladas no trato urogenital de indivíduos sexualmente ativos, sendo três patogénicos para os humanos, nomeadamente *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma genitalium*.⁵¹

Para o diagnóstico da infeção por micoplasmas urogenitais, é utilizado no laboratório da Synlab Alentejo, o dispositivo Mycoplasma IST 2, da Biomérieux. A seguinte galeria permite a cultura, identificação, contagem indicativa e a realização do teste de sensibilidade aos antibióticos de micoplasmas urogenitais, nomeadamente de *Ureaplasma* spp. e *M. hominis*. É constituída por vinte e dois testes e por um caldo de cultura seletivo que se adapta ao crescimento dos micoplasmas. A presença de substratos específicos, como a ureia para o *Ureaplasma* spp. e arginina para *M. hominis* e a presença de um indicador de pH permite visualizar uma alteração da cor do meio, caso esta seja positiva para estes microrganismos. A associação de três

antibióticos e de um antifúngico propicia que o meio seja seletivo, pois permite a eliminação de microbiota contaminante. Portanto, o dispositivo encontra-se dividido em três partes, da cúpula 1 a 3 são utilizadas para a identificação, as cúpulas 4 e 5 são utilizadas para a contagem indicativa, isto é, determina se o título do micoplasma na amostra é igual ou superior ao limiar estabelecido de 10^4 UFC e da cúpula 6 a 22 permitem testar a sensibilidade do microrganismo a nove antibióticos distintos.

Este dispositivo pode ser utilizado com amostras uretrais, cervico-vaginais e em esperma, sendo a colheita de amostras uretrais e cervico-vaginais realizada com zaragatoa, que é imediatamente colocada no meio líquido e semeada na galeria o mais rapidamente possível. Após inoculada, a galeria e o meio líquido que sobrou são colocados a incubar na estufa durante 24-48 horas, a uma temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$, sendo posteriormente interpretados.

5.4.7. Análise microbiológica de amostras do trato respiratório

Neste último ano e meio, a COVID-19 demonstrou à população o quanto grave pode ser uma infecção do trato respiratório, podendo causar pneumonias graves e levar à morte. Estas infecções representam cerca de 20% da mortalidade em crianças nos países em desenvolvimento e dividem-se em dois grandes grupos, isto é, as que envolvem o trato respiratório superior, que inclui a cavidade nasal e oral, a laringe e a faringe. Por outro lado, as que envolvem o trato respiratório inferior envolvem a traqueia, os pulmões, brônquios, bronquíolos e os alvéolos pulmonares.⁵³

Estas infecções podem ser causadas por vírus ou bactérias, ocorrendo uma doença aguda e em alternativa, uma doença crónica através de fungos ou micobactérias. No entanto, a capacidade de resposta imunitária do hospedeiro é um dos fatores principais para a progressão da doença por parte do microrganismo patogénico, assim como a sua virulência.⁵³

Desta maneira, as principais bactérias que provocam infeções respiratórias no trato respiratório superior são *Streptococcus pyogenes*, que provoca faringite e *S. pneumoniae* que provoca sinusite e otite média. Já no trato respiratório inferior, *Moraxella catarrhalis*, *H. influenzae* e *S. pneumoniae* causam bronquite. As principais causadoras de pneumonia são as bactérias *S. aureus*, *S. pneumoniae* e *K. pneumoniae*.⁵²

Os principais produtos biológicos utilizados para o diagnóstico de infeções respiratórias são a expectoração, o exsudado nasal, o exsudado faríngeo e o exsudado auricular. No entanto, é descrito de seguida a marcha analítica de amostras de expectoração e do exsudado faríngeo, que são as amostras mais frequentes no respetivo laboratório.

a) Expetoração

A marcha analítica das amostras de expetoração inclui a pesquisa de eosinófilos com coloração de May-Grünwald-Giemsa, o exame microscópico direto com coloração de Gram e coloração de Ziehl-Neelsen modificada e o exame cultural, que engloba o exame micológico e bacteriológico. Nas amostras de secreções líquidas, é necessário proceder em primeiro lugar ao tratamento da amostra através da centrifugação a 1500 rpm, durante cinco minutos, descartado o sobrenadante.

Exame microscópico direto

Para a pesquisa de eosinófilos pelo exame direto da amostra, a lâmina é corada com coloração de May-Grünwald-Giemsa (descrito detalhadamente em 5.3.3), que permite avaliar a existência de processos inflamatórios nas vias aéreas, verificando e avaliando a severidade da inflamação e a resposta ao tratamento em caso de doentes asmáticos.⁵⁴

Para o exame microscópico direto com coloração de Gram e Ziehl-Neelsen modificada, é utilizada a amostra com pus ou sangue e para efetuar os esfregaços. Depois de secos, são efetuados os procedimentos de coloração nas lâminas (descrito detalhadamente em 5.4.1) e são visualizadas ao microscópio ótico. Nas lâminas coradas com coloração de Gram, é essencialmente avaliada a presença de microrganismos de GP e de GN ou se existe predomínio de células epiteliais significando que a amostra é constituída por saliva. Por outro lado, a coloração de Ziehl-Neelsen modificada em amostras de expetoração é utilizada para a pesquisa de micobactérias.

Exame cultural

Uma pequena quantidade de amostra é semeada nos meios de gelose COS, SGC e HAE2 com auxílio de uma ansa calibrada descartável de 10 µl. Posteriormente, as placas de COS e HAE2 são colocadas a incubar na estufa em aerobiose, a uma temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18-24 horas e a placa de SGC é colocada a incubar durante 18-72 horas, a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ em regime de aerobiose.

Posteriormente, as placas são observadas e se for observado crescimento de colónias nos meios COS e HAE2 e se este for valorizável, é reisolado o microrganismo nas placas respetivas, que são colocadas na estufa durante 18-24 horas, a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Passado esse período, é feita a valorização das colónias obtidas tendo em conta o que foi observado no exame direto e no exame cultural. A marcha analítica da amostra difere consoante seja observada morfologia sugestiva de cocos de GP, cocos de GN ou bacilos de GN.

Se forem observados cocos de GP, são realizados os testes da catalase e da optoquina (descritos detalhadamente em 5.4.3). Em relação ao teste com optoquina, o crescimento de microrganismos sensíveis à optoquina é sugestivo de *S. pneumoniae*, sendo realizado o teste de sensibilidade aos antibióticos no aparelho VITEK® 2 Compact através da carta ST03. Por outro lado, se o teste da catalase for positivo, é realizado o teste da coagulase e se este for positivo, é sugestivo de infecção por *S. aureus*, sendo realizado o teste de sensibilidade aos antibióticos no aparelho VITEK® 2 Compact através da carta P648. Por outro lado, se forem observados cocos de GN, a amostra é enviada para um laboratório subcontratado.

Por último, se forem observados bacilos de GN procede-se à realização do teste da oxidase e pesquisa da dependência de fatores de crescimento X e V. Em consequência, se a oxidase for positiva, é realizada a identificação e teste de suscetibilidade aos antibióticos no equipamento VITEK® 2 Compact através das cartas GN e N373, mas se o teste da oxidase for negativo, a identificação e o teste de suscetibilidade aos antibióticos são realizados no equipamento VITEK® 2 Compact através das cartas GN e N359 (ver Tabelas 8 e 9). No entanto, a pesquisa da dependência de fatores de crescimento X e V permite a identificação presuntiva de *H. influenzae*, e assim através de uma suspensão em 0,85% de NaCl ajustada a 0,5 McFarland, a placa de gelose de MHE é inoculada e sob esta são colocados os discos com os fatores X, V e X+V, sendo posteriormente a placa colocada a incubar 18-24 horas, a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Ao mesmo tempo é realizado o teste de sensibilidade aos antimicrobianos através da galeria ATB™ HAEMO EU (08) e os resultados são lidos posteriormente.

No exame micológico, se se observar crescimento na placa de SGC é realizada a observação direta das células entre lâmina e lamela e se visualizar hifas septadas hialinas é sugestivo de *Aspergillus*. Ao mesmo tempo é realizado o teste de filamentação (descrito detalhadamente em 5.4.3) e se este for positivo o resultado é reportado como *C. albicans*, enquanto se for negativo, é realizada a identificação do microrganismo no aparelho VITEK® 2 Compact através da carta YST.

b) Exsudado faríngeo

A análise do exsudado faríngeo é realizada através do exame cultural, sendo o inóculo aplicado diretamente pela zaragatoa nos meios de gelose COS, SGC e no meio líquido BHI. Quando solicitado é também semeada para o meio de gelose PVX (ver Tabela 7). As placas são colocadas a incubar na estufa em aerobiose, a uma temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18-24 horas, com exceção da placa de SGC, que é colocada a incubar durante 18-48 horas, a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ em regime de aerobiose. Após o período de incubação, as placas são observadas e há

passagem do meio líquido para uma nova placa de Gelose COS, que é posteriormente colocada a incubar na estufa em aerobiose, a uma temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18-24 horas.

Se na gelose de COS, as colónias forem sugestivas de *S. aureus* (Figura 16) e se o teste da catalase for positivo, realiza-se o teste da coagulase em lâmina. Se este último for positivo, o resultado é indicativo de *S. aureus*, sendo realizado o teste de sensibilidade aos antibióticos no aparelho VITEK® 2 Compact através da carta P648.

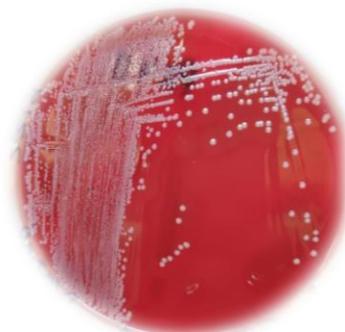


Figura 16 - Colónias sugestivas de *S. aureus* em gelose COS. Observação realizada Synlab Alentejo.

Por outro lado, se na placa de COS forem observadas colónias suspeitas com zonas de β -hemólise, é realizado um reisolamento da colónia para uma nova placa de COS e realização de testes de identificação (descritos detalhadamente em 5.4.3). A placa é incubada na estufa em aerobiose, a uma temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18-24 horas. Após o período de incubação, se o crescimento for valorizável e se verificarem zonas de β -hemólise (Figura 17) é sugestivo de *Streptococcus* β -hemolíticos dos grupos A, C ou G de Lancefield, sendo realizado o teste de identificação no aparelho VITEK® 2 Compact através da carta GP. Se a identificação for indicativa de *S. agalatae* ou *Enterococcus* spp., é realizado o teste de sensibilidade pela carta AST-P586 no aparelho VITEK® 2 Compact. Se o resultado da carta GP for indicativo de *S. pneumoniae*, *Streptococcus* β -hemolíticos ou *Streptococcus viridans*, o teste de sensibilidade é realizado através da carta AST-ST03 (ver Tabelas 8 e 9).



Figura 17 - Colónias com β -hemólise em gelose COS. Observação realizada Synlab Alentejo.

Em relação ao meio de SGC, o desenvolvimento deste é igual ao procedimento da marcha analítica da expetoração.

5.4.8. Análise bacteriológica de fezes- Coprocultura

As infeções gastrointestinais podem ser causadas por vários microrganismos, nomeadamente, bactérias, vírus ou parasitas, tendo as crianças maior risco de desenvolverem esse tipo de infeção, mas também pode ser causada por ingestão de medicamentos ou ingestão de toxinas. A diarreia é normalmente o sintoma mais comum de gastroenterite, associado a vómitos, dor abdominal, náuseas e ejeção de fezes por mais de três vezes ao dia.⁵⁵

No trato gastrointestinal há colonização de uma grande variedade de microrganismos que constituem a microbiota comensal e que permite o desenvolvimento do sistema imunitário desse local, competindo com bactérias patogénicas e impedindo o seu desenvolvimento. No entanto, se existirem desequilíbrios na microbiota intestinal pode ocorrer um descontrolo no metabolismo do hospedeiro o que pode provocar infeções ou inflamações a nível da mucosa intestinal e quando surge o agravamento dos sintomas ou dúvidas, deve-se recorrer ao exame microbiológico das fezes, através da coprocultura.⁵²

As principais bactérias que causam gastroenterite bacteriana são a *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *E. coli* enteropatogénica e enterohemorrágica, *Campylobacter* spp., *Clostridioides difficile*, *Yersinia enterocolitica* e *Vibrio cholerae*. Algumas infeções gastrointestinais são provocadas pela ingestão de alimentos contaminados, provocando intoxicações alimentares pelas exotoxinas bacterianas e presentes nos alimentos, e não pela colonização bacteriana. Neste caso, mencionam-se bactérias tais como *S. aureus*, *Clostridioides perfringens* e *Clostridium botulinum*.⁵²

No laboratório da Synlab Alentejo, a coprocultura é realizada através da amostra de fezes colhida diretamente para um contentor contendo um meio de transporte e semeada diretamente nas placas com uma ansa de 10µl descartável. Devido aos inúmeros microrganismos presentes das fezes, são utilizados meios seletivos para semear, nomeadamente a gelose de CAM, SALM, XLD, MSA2, MCK, SGC e meio líquido Selenito-F, sendo que o meio CAM é semeado em primeiro lugar e por último o meio líquido. O meio MSA2 só é semeado se o utente for uma criança menor de 2 anos. Todos os meios incubam durante 18 a 24 horas a 35 ± 2°C, com exceção do meio CAM, que incuba durante 48 horas a 35 ± 2°C em microaerofilia, recorrendo a uma saqueta GENbag microaer, da Biomérieux.

Após o período de incubação, as placas são observadas e há passagem do meio líquido para uma nova placa de Gelose SALM e XLD, que é posteriormente colocada a incubar na estufa em aerobiose, a uma temperatura de 35 ± 2°C durante 18-24 horas. Posteriormente, se for observado crescimento de colónias com morfologia sugestiva, são realizados testes de identificação apropriados e depois os testes de identificação e sensibilidade no aparelho VITEK® 2 Compact.

5.4.9. Exame parasitológico de fezes

A melhoria das condições sanitárias permitiu que a prevalência dos parasitas no organismo humano tenha diminuído, no entanto, ainda estão prevalentes, nomeadamente nos grupos de crianças, doentes imunodeprimidos, viajantes, entre outros. Qualquer indivíduo com queixas

gastrointestinais deve ser submetido a um estudo de pesquisa de parasitas intestinais, uma vez que o exame parasitológico de fezes tem como principal objetivo a pesquisa de trofozoítos, quistos, ovos, e parasitas adultos nas fezes. Uma vez que os parasitas não surgem coerentemente ao longo do dia, são solicitadas três amostras de dias diferentes, para que a probabilidade de detetar parasitas seja superior, depositadas no recipiente próprio.⁵²

Na Synlab Alentejo este exame é realizado utilizando o *kit* Mini Parasep® SF (Apacor), um concentrador de estruturas de parasitas fecais, que permite separar as estruturas parasitárias do material fecal. Este *kit* permite a concentração de amostras fecais, sendo a amostra de fezes adicionada ao tubo contendo um agente fixador à base de álcool. O tubo é posteriormente centrifugado a 1500 rotações durante 2 minutos, sendo obtida uma extração de resíduos e gordura para a fase etérea e um sedimento concentrado. Para observação microscópica é colocada uma gota do sedimento numa lâmina e cobre-se com lamela, observando-se em primeiro lugar com a objetiva de 20x e depois de 40x.⁵⁶

5.4.10. Testes rápidos

a) Pesquisa de sangue oculto nas fezes

O cancro colorretal é comum e pode ser fatal. A sua deteção precoce possibilita um melhor tratamento e pode ser feita através de uma análise não invasiva, isto é, pela pesquisa de sangue oculto nas fezes.⁵⁷

Na Synlab Alentejo, a pesquisa de sangue oculto nas fezes é realizada por um ensaio imunocromatográfico rápido para a deteção qualitativa de Hb. A técnica tem o princípio de duplo anticorpo-sanduíche, ou seja, a amostra reage com um anticorpo monoclonal específico marcado com ouro. Essa junção vai migrar na membrana por capilaridade e reagir com anticorpos anti-hemoglobina presentes na membrana, originando uma linha colorida. A presença desta linha colorida na região controlo e na região teste indica um resultado positivo, enquanto que a sua ausência na região teste indica um resultado negativo.

b) Teste de gravidez na urina

A gonadotrofina coriónica humana (hCG) é uma hormona glicoproteica, composta por duas subunidades, a α e a β , unidas de forma não covalente. A hCG é produzida, após a fertilização, pelo tecido trofoblasto durante a gravidez. Esta hormona pode ser detetada em concentrações séricas e urinárias que aumentam exponencialmente no primeiro trimestre da gravidez, atingindo o seu pico entre as 10 e as 12 semanas de gestação. Portanto, devido à sua elevada concentração muito cedo na gravidez, a hCG é um bom marcador para testes de gravidez.⁵⁸

Na Synlab Alentejo, a deteção qualitativa da hormona hCG é realizada em amostras de urina através de um teste rápido, designado como Diagnóstico imunológico da gravidez (DIG) através de ensaio imunocromatográfico que contém anticorpos monoclonais. A linha de teste encontra-se marcada com anticorpos monoclonais anti-hCG e a amostra migra ao longo da membrana por capilaridade para reagir com esta. A presença desta linha colorida na região controlo e na região teste indica um resultado positivo, enquanto que a sua ausência na região teste indica um resultado negativo.

5.4.11. Caso Clínico de Microbiologia

Um utente do sexo masculino, com 55 anos apresentou-se para a realização de análises de rotina. Foram realizadas análises de perfil hematológico, bioquímico e microbiológico. Em relação à secção de microbiologia, realizou-se a análise à urina do tipo II, que se observou parâmetros dentro da normalidade e exame parasitológico de três amostras de fezes.

O utente encontrava-se assintomático, sem sintomas de diarreia. No entanto, após a realização do exame parasitológico das três amostras de fezes utilizando o kit Mini Parasep® SF (Apacor), observou-se ao microscópio um número elevado de quistos de *Giardia lamblia*, um parasita intestinal, eucariota unicelular, flagelado, cuja transmissão é fecal-oral, ou seja, o ciclo de vida é monoxeno.

Se o utente tivesse sintomatologia, verificava-se na análise bioquímica um défice na absorção de lípidos, nomeadamente a vitamina B12. O resultado foi entregue, permitindo ao clínico prescrever o melhor tratamento possível, aconselhando também as medidas preventivas que o utente teria de ter.

6. FASE PÓS-ANALÍTICA

A fase pós-analítica engloba os últimos procedimentos laboratoriais, nomeadamente a revisão e validação dos resultados, armazenamento, conversação e eliminação de amostras clínicas, emissão e transmissão do boletim clínico e gestão da informação clínica dos utentes.³

6.1. VALIDAÇÃO BIOPATOLÓGICA

De acordo com o Despacho n.º 100009/2019 de 5 de novembro, a validação consiste em duas etapas. Por um lado, a validação analítica dos resultados é processada por um colaborador que executou a análise e que tem competência reconhecida pelo diretor técnico, permitindo a verificação dos indicadores de bom funcionamento, nomeadamente as condições de colheita, transporte, tratamento, processamento das amostras, dos equipamentos e o conhecimento

dos resultados do CQI. Por outro lado, a validação biopatológica é da competência específica do especialista em análises clínicas e permite assegurar a uniformidade dos resultados do utente ao longo do tempo e consoante a sua história clínica, o qual assina o boletim e, se necessário, sugere repetição da colheita para aferir se existe concordância nos resultados.⁷

A validação biopatológica dos resultados é realizada através do sistema informático implementado na Synlab Atentejo, o Appolo e os resultados são expressos com as unidades utilizadas pelo Sistema Internacional (SI) ou intervalos de referência.

6.2. ARMAZENAMENTO, CONSERVAÇÃO E ELIMINAÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

No final de cada dia de trabalho, as amostras são conservadas em virtude de poder ser necessário a repetição de análises aquando da validação biopatológica ou acréscimo no pedido. Considerando o tipo de amostra, estas são refrigeradas ou congeladas por um período mínimo de meses ou anos, a diferentes temperaturas. Os soros são refrigerados por um período mínimo de quatro dias de 2°C a 8°C e nos casos especiais, como IgM (Toxoplasma, Rubeóla e CMV), HIV e HCV positivos são congelados por um período mínimo de um ano a -20°C. Enquadrados nas amostras de sangue total, os hemogramas no primeiro dia ficam guardados à temperatura ambiente e depois são refrigerados por um período de dois dias de 2°C a 8°C; as HbA1c, os grupos sanguíneos e o estudo das hemoglobinas por um período de três dias de 2°C a 8°C. Por outro lado, inserida nas amostras de plasma, a coagulação é congelada por dois dias a -20°C e nos outros casos por quatro dias de 2°C a 8°C. Já as urinas do tipo II, DIG, fezes e esperma são refrigerados durante três dias de 2°C a 8°C; as uroculturas são refrigeradas 2°C a 8°C até à conclusão do ensaio e as urinas para estudo bioquímico por um período de quatro dias de 2°C a 8°C. Por último, os exsudados e expetorações são armazenados durante três dias à temperatura ambiente.

Em relação à gestão dos lixos, estes são divididos em dois grupos, Resíduos não perigosos e Resíduos perigosos e são recolhidos no mínimo duas vezes por semana. Dentro dos Resíduos perigosos, o lixo do grupo III (risco biológico) é armazenado em contentores verdes com saco transparente e contém amostras biológicas. O lixo do Grupo IV é armazenado em contentores amarelos que estão devidamente identificados com o símbolo de risco biológico e contém materiais cortantes e perfurantes. Por último, os Resíduos Especiais perigosos contém resíduos líquidos de risco biológico e são colocados dentro bidões. Por outro lado, dentro dos Resíduos não perigosos, não somente o lixo do Grupo I engloba a reciclagem de todo o material proveniente de serviços gerais e de apoio, mas também o lixo do Grupo II (resíduos

urbanos) são armazenados em contentores normais e contém material que não é reciclado e não contaminado. Além disso, o material de plástico é de uso único e o material de vidro é lavado e reutilizado desde que não esteja cortante.

7. CONCLUSÃO

A realização do estágio no Laboratório de Análises Clínicas Synlab Alentejo, em Évora, revelou-se um complemento indispensável à minha formação, permitindo consolidar os conhecimentos teóricos e práticos, o qual proporcionou a aplicação de conceitos e técnicas adquiridas ao longo do percurso académico no contexto real do laboratório de análises clínicas. Além disso, o facto de estagiar num laboratório central concedeu uma ampla variedade de amostras biológicas, permitindo ter uma experiência bastante enriquecedora do que diz respeito ao manuseamento de amostras e a sua análise.

Relativamente ao objetivo do estágio, pode concluir-se que os objetivos propostos foram cumpridos e que todas as tarefas/atividades foram realizadas com sucesso. Deste modo, a experiência e as competências adquiridas no âmbito do estágio laboratorial constitui uma mais valia no que diz respeito ao manuseamento e processamento de amostras biológicas, na manutenção diária dos vários equipamentos, na realização das vastas metodologias utilizadas e no controlo da qualidade, adquirindo uma atitude crítica sobre o modo de atuação. Como complemento ao estágio, acompanhei também os procedimentos de vários tipos de colheitas e a respetiva triagem proporcionando uma visão do processo geral da fase pré-analítica.

Como reflexão final, é deveras importante realçar que para além da componente científica, a componente interpessoal contribui para um término vitorioso do estágio laboratorial, uma vez que desenvolver o trabalho em equipa é uma mais valia para os objetivos serem alcançados, haver sucesso profissional e também obtenção de autoestima individual. Mediante o exposto, contar com o acompanhamento diário e a afabilidade por parte de toda a equipa de profissionais permitiu que esta etapa acrescentasse pontos positivos à formação profissional e pessoal.

Por último, assinalo como ponto menos positivo o facto de não termos a possibilidade de termos a formação enquanto estágio no processo de colheitas. No entanto, o facto de ter sido possível visualizar num certo período o processo de colheitas e triagem proporcionou uma visão dessa etapa nas análises clínicas.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Plebani, M., Sciacovelli, L., Aita, A., & Chiozza, M. L. (28 de novembro de 2013). Harmonization of pre-analytical quality indicators. *Biochimica Medica*, pp. 105-113. doi:10.11613/BM.2014.012
2. Bonini, P., Plebani, M., Ceriotti, F., & Rubboli, F. (2002). Errors in Laboratory Medicine. Em *Clinical Chemistry* (pp. 691-698).
3. Hawkins, R. (2012). Managing the Pre- and Post-analytical Phases of the Total Testing Process. pp. 5-16. doi:10.3343/alm.2012.32.1.5
4. Burtis, C. A., & Bruns, D. E. (2016). Tietz Fundamentos de Química Clínica e Diagnóstico Molecular (7ª ed.). Elsevier Editora Ltda. ISBN: 978-85-352-8166-8
5. Atay, A., Demir, L., Cuhadar, S., Saglam, G., Unal, H., Aksun, S., Arslan, B.; Ozkan, A.; Sutcu, R. (22 de July de 2014). Clinical biochemistry laboratory rejection rates due to various types of preanalytical errors. *Biochimica Medica*, pp. 376-382. doi:10.11613/BM.2014.040
6. International Organization for Standardization. (s.d.). *ISO/TS 22367:2008 - Medical laboratories — Reduction of error through risk management and continual improvement*. Obtido em 29 de maio de 2021, de <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:ts:22367:ed-1:vl:en>
7. Gabinete do Secretário de Estado Adjunto e da Saúde. (5 de novembro de 2019). Despacho n.º 10009/2019. *Diário da República, 2ª série(212), Parte C*, 66-80.
8. Kinns, H., Pitkin, S., Housley, D., & Freedman, D. B. (2 de September de 2013). Internal quality control: best practice. pp. 1027–1032. doi:10.1136/jclinpath-2013-201661
9. Fuentes-Arderiu, X., Batista-Castellví, J., Canalias, F., Dot-Bach, D., Martínez-Casademont, M., & Miró-Balague, J. (22 de May de 2007). Internal quality control and ISO 15189. pp. 369-375. doi:10.1007/s00769-007-0269-2
10. Instituto Português da Qualidade. (15 de dezembro de 2015). Norma Portuguesa - ISO 9000:2015.
11. Vieira, K. F., Shitara, E. S., Mendes, E. M., & Sumita, N. M. (20 de junho de 2011). A utilidade dos indicadores da qualidade no gerenciamento de laboratórios clínicos. *47(3)*, pp. 201-210.

12. Murray, R., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J., Rodwell, V. W., & Weil, P. A. (2009). *Harper's Illustrated Biochemistry* (28^a ed.). McGraw-Hill Companies, Inc. ISBN: 978-0-07-162591-3
13. Colombeli, A. S., & Falkenberg, M. (20 de abril de 2006). Comparação de bulas de duas marcas de tiras reagentes utilizadas no exame químico de urina. 42(2), pp. 85-93.
14. Murphy, M., Scrivastava, R., & Deans, K. (2019). *Clinical Biochemistry* (6^a ed.). Elsevier Editora. ISBN: 978-0-7020-7298-7
15. Cavanaugh, C., & Perazella, M. A. (February de 2019). Urine Sediment Examination in the Diagnosis and Management of Kidney Disease: Core Curriculum 2019. 73(2), pp. 258-272. doi:10.1053/j.ajkd.2018.07.012
16. Whicher, J. T., & Spence, C. E. (1984). Serum protein zone electrophoresis-an outmoded test? *Ann Clin Biochem*, pp. 133-139.
17. Kasper, D. L., Hauser, S. L., Jameson, J. L., Fauci, A. S., Longo, D. L., & Loscalzo, J. (2015). *Harrison - Principios de Medicina Interna* (19^a ed., Vol. 2). (M. E. Martínez, J. R. Pinto, A. M. Tamayo, S. L. Albarrán, H. B. Villavicencio, & P. T. Rhoana, Trans.) McGraw-Hill Education. ISBN: 978-607-15-1337-3
18. Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2011). *Cellular and Molecular Immunology* (7^a ed.). Elsevier.
19. Arosa, F. A., Cardoso, E. M., & Pacheco, F. C. (2012). *Fundamentos de Imunologia* (2^a ed.). Lidel. ISBN: 978-972-757-856-6
20. Hoffbrand, A. V., Catovsky, D., & Tuddenham, E. G. (2005). *Postgraduate Haematology* (5^a ed.). Blackwell Publishing.
21. Smart, E., & Armstrong, B. (2020). Blood group systems. *ISBT Science Series*, 15(6), pp. 123-150. doi:10.1111/voxs.12593
22. González, I. P., Garcés, J. P., & Behnke, J. P. (2005). *Hematología - Fisiopatología y Diagnóstico*. Editorial Universidad de Talca. ISBN: 978-956-7059-85-0
23. Hoffbrand, A. V., & Moss, P. A. (2018). *Fundamentos em Hematologia de Hoffbrand* (7^a ed.). (R. Failace, Trad.) Artmed Editora. ISBN: 978-85-8271-450-8
24. Celkan, T. T. (19 de june de 2020). What does a hemogram say to us? 55(2), pp. 103-116. doi:10.14744/TurkPediatriArs.2019.76301

25. Sysmex. (2021). Sysmex. Obtido em 5 de Junho de 2021. Disponível na internet: <https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Pages/Sysmex-Product-Overview.aspx>
26. Tanaka, Y., Sakairi, K., & Tanaka, Y. (2011). *XN-Series: Automated Hematology Analyzer - Clinical Case Report* (1ª ed., Vol. 1). Sysmex Corporation.
27. Longo, D. L., Kasper, D. L., Jameson, J. L., Fauci, A. S., Hauser, S. L., & Loscalzo, J. (2012). *Harrison - Principios de Medicina Interna* (18ª ed., Vol. 1). (Pinto, José Rafael, Martínez, Martha Elena Araiza; , A. M. Ruíz, G. E. Cotera, S. L. Albarrán, J. L. Hernández, & A. H. Chong, Trans.) The McGraw-Hill Companies. ISBN: 978-607-15-0728-0
28. Rodak, B. F. (2005). *Hematología. Fundamentos y Aplicaciones Clínicas*. (2ª ed.). Editorial Médica Panamericana. ISBN: 950-06-1876-1
29. International Council for Standardization in Haematology. (1993). ICSH recommendations for measurement of erythrocyte sedimentation rate. 46, pp. 198-203.
30. Caswell, M., & Stuart, J. (1991). Assessment of Diesse Ves-matic automated system for measuring erythrocyte sedimentation rate. 44, pp. 946-949.
31. DIESSE Diagnostica Senese Spa (2021). VES-MATIC CUBE 80. Obtido em 9 de junho de 2021. Disponível na internet: <https://www.diesse.it/en/products/ves-matic-cube-80/>
32. Bain, B. J., Bates, I., Laffan, M. A., & Lewis, S. M. (2011). *Dacie and Lewis Practical Haematology* (11ª ed.). Elsevier. ISBN: 9780702034084
33. TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., & CASE, C. L. (2012). *Microbiologia* (10ª ed.). Artmed Editora. ISBN: 978-85-363-2698-6
34. Ryan, K. J., & Ray, C. G. (2011). *Sherris. Microbiología Médica* (5ª ed.). (S. M. Bari, & G. A. Rebatet, Trans.) The McGraw-Hill Companies. ISBN: 978-0-07-160402-4
35. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2008). *Medical Microbiology* (6ª ed.). Elsevier. ISBN: 9780323054706
36. Mahon, C. R., Lehman, D. C., & Manuselis, G. (2015). *Textbook of Diagnostic Microbiology* (5ª ed.). Elsevier. ISBN: 978-0-323-08989-0
37. Benner, E. J. (1970). Simple Disposable Method for Quantitative Cultures of Urine. 19(3), pp. 409-412.

38. Ryan, K. J., & Ray, C. G. (2014). *Sherris. Medical Microbiology* (6^a ed.). McGraw-Hill Education. ISBN: 978-0-07-181826-1
39. Ng, L.-K., & Martin, I. E. (2005). The laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*. *16*(1), pp. 15-25.
40. Merz, W. G., Sandford, G., & Evans, G. L. (may de 1976). Clinical Evaluation of the Addition of Gentamicin to Commercially Prepared Mycological Media. *Journal of Clinical Microbiology*, 3(5), 496-500.
41. Orenge, S., James, A. L., Manafi, M., Perry, J. D., & Pincus, D. H. (2009). Enzymatic substrates in microbiology. *Journal of Microbiological Methods*. doi:10.1016/j.mimet.2009.08.001
42. Chapman, G. H. (1945). The Significance of Sodium Chloride in Studies of Staphylococci. (C. R. Laboratory, Ed.) pp. 201-203.
43. Ng, L.-K., Taylor, D. E., & Stiles, M. E. (1988). Characterization of Freshly Isolated *Campylobacter coli* Strains and Suitability of Selective Media for Their Growth. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(3), 518-523.
44. Louie, L., Kotowich, L., Meaney, H., Vearncombe, M., & Simor, A. E. (2010). Evaluation of a New Chromogenic Medium (StrepB Select) for Detection of Group B Streptococcus from Vaginal-Rectal Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(12), 4602–4603. doi:10.1128/JCM.01168-10
45. Baker, C. J., Clark, D. J., & Barrett, F. F. (1973). Selective Broth Medium for Isolation of Group B Streptococci. *Applied Microbiology*, 26(6), 884-885.
46. Boer, M. D.-d., Boer, R. F., Lameijer, A., Sterne, E., Skidmore, B., Suijkerbuijk, A. W., Heck, M.; Zanden, A. G. (2019). Selenite enrichment broth to improve the sensitivity in molecular diagnostics of Salmonella. *Journal of Microbiological Methods*, 59–64. doi:10.1016/j.mimet.2018.12.018
47. Biomérieux. (2021). *VITEK® 2: Product Safety*. Obtido em 14 de agosto de 2021. Disponível na internet: <https://www.biomerieux-usa.com/industry/vitek-2-product-safety>
48. Sanders, C. C., Peyret, M., Moland, E. S., Cavalieri, S. J., Shubert, C., Thomson, K. S., Boeufgras J.; Sanders, W. E. (2001). Potential Impact of the VITEK 2 System and the Advanced Expert System on the Clinical Laboratory of a University-Based Hospital.

Journal of Clinical Microbiology, 39(7), 2379–2385. doi:10.1128/JCM.39.7.2379–2385.2001

49. Barenfanger, J., Drake, C., & Kacich, G. (1999). Clinical and Financial Benefits of Rapid Bacterial Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(5), 1415–1418. doi:10.1128/JCM.37.5.1415-1418.1999
50. Mistério da Saúde; Instituto Nacional de Saúde. (2004). Manual de Boas Práticas em Bacteriologia.
51. Unemo, M., Ballard, R., Ison, C., Lewis, D., Ndowa, F., & Peeling, R. (2013). Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. World Health Organization.
52. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Tenover, M. C. (2016). *Medical Microbiology* (8^a ed.). Elsevier. ISBN: 978-0-323-29956-5
53. Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., & Mietzner, T. A. (2013). *Jawetz, Melnick, & Adelberg's. Medical Microbiology* (26^a ed.). The McGraw-Hill Companies.
54. Weiszhar, Z., & Horvath, I. (june de 2013). Induced sputum analysis: step by step. 9(4), pp. 301-306. doi:10.1183/20734735.042912
55. Sell, J., & Dolan, B. (2018). Common Gastrointestinal Infections. pp. 519–532. doi:10.1016/j.pop.2018.05.008
56. Couturier, B. A., Jensen, R., Arias, N., Heffron, M., Gubler, E., Case, K., . . . Couturier, M. R. (August de 2015). Clinical and Analytical Evaluation of a Single-Vial Stool Collection Device with Formalin-Free Fixative for Improved Processing and Comprehensive Detection of Gastrointestinal Parasites. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(8), 2539-2548. doi:10.1128/JCM.00838-15
57. Simon, J. B. (1985). Occult Blood Screening for Colorectal Carcinoma: A Critical Review. 88(3), pp. 820-837.
58. Cole, L. A. (1 de december de 1997). Immunoassay of human chorionic gonadotropin, its free subunits, and metabolites. *Clinical Chemistry*, 43(12), 2233–2243. doi:10.1093/clinchem/43.12.2233

Anexo I
Tabela 11 - Valores de referência do hemograma no laboratório da Synlab Alentejo.

Parâmetros Analíticos	Valores de Referência
Eritrócitos	4,50-5,90 $\times 10^{12}/L$ nos homens 4,0-5,20 $\times 10^{12}/L$ nas mulheres
Hb	13,5-17,5 g/dL nos homens 12,0-16,0 g/dL nas mulheres
Ht	41,0-53,0% nos homens 36,0-46,0% nas mulheres
VGM	80-100 fL
HGM	26-34 pg
CHGM	32-36 g/dL
RDW	11,6-14,0%
Leucócitos	4,0-10,0 $\times 10^9/L$
Neutrófilos	1,8-7,0% ou $\times 10^9/L$
Eosinófilos	<0,5% ou $\times 10^9/L$
Basófilos	<0,1% ou $\times 10^9/L$
Linfócitos	1,0-4,0% ou $\times 10^9/L$
Monócitos	0,2-1,0% ou $\times 10^9/L$
Plaquetas	150-400 $\times 10^9/L$
VPM	8,5-12,8 fL
PCT	0,17-0,38%

Anexo II
Tabela 12 - Valores de referência no laboratório da Synlab Alentejo.

Parâmetros Analíticos	Valores de Referência
TP	11,8-15,1 segundos Taxa: 70-134% INR: 2-3
aPTT	23-35 segundos
Fibrinogénio	169-515 mg/dL

Anexo III

De seguida, encontram-se descritos detalhadamente os meios de cultura utilizados no respetivo laboratório, mencionados no ponto 5.4.2 – Meios de cultura.

a) Meio cistina lactose deficiente em eletrólitos

O meio de gelose cistina lactose deficiente em eletrólitos (CLED) da Biomérieux é utilizado para o isolamento de microrganismos referentes ao trato urinário. Este meio diferencia as bactérias fermentadoras da lactose, como por exemplo, *E. coli* e não fermentadoras da lactose, como por exemplo, *Pseudomonas* spp. O meio é inoculado diretamente com urina e após incubação observam-se bactérias positivas para a fermentação da lactose se ocorrer produção de colónias amarelas pálidas e amarelas, devido à acidificação do meio ou bactérias negativas para a fermentação da lactose se ocorrer produção de colónias verdes, azuis ou incolores. Também a composição do meio evita o *swarming* do género *Proteus*.³⁷

b) Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro

O meio Gelose Columbia com 5% de sangue de cordeiro (COS) é um meio não seletivo enriquecido que facilita o crescimento/ isolamento de microrganismos fastidiosos. A adição de sangue de cordeiro a um meio base, torna o meio rico e nutritivo, devido à mistura de peptonas, facilitando o crescimento de estreptococos, por exemplo. Para além disso, permite a deteção de hemólise, sendo este parâmetro utilizado para orientar a identificação bacteriana, ou seja, pode ser uma β -hemólise, quando há eliminação completa das hemácias ao redor da colónia; uma α -hemólise, quando há uma eliminação incompleta das hemácias com presença de cor esverdeada devido aos produtos de degradação de Hb. Por último, pode ser uma γ -hemólise em que não há presença de hemólise. Este meio também é adequado para o isolamento de bactérias anaeróbias.^{35, 38}

c) Gelose Chocolate Haemophilus

O meio Chocolate Haemophilus (HAE2) é um meio seletivo que permite o isolamento das diferentes espécies de *Haemophilus* provenientes de produtos patológicos das vias respiratórias ou de origem genital, uma situação mais rara. Este meio é constituído por uma base nutritiva rica em fatores X (hemina) e fator V (dinucleótido de nicotinamida adenina - NAD). Como mencionado anteriormente, é um meio seletivo graças à adição de antibióticos e antifúngicos que inibem a maioria das bactérias de GP e de leveduras.³⁸

d) Gelose Chocolate PolyViteX

O meio Gelose Chocolate PolyViteX (PVX) é um meio de isolamento para bactérias fastidiosas, recomendado para o crescimento dos gêneros *Neisseria* e *Haemophilus*, e de *S. pneumoniae*. Este meio também é constituído por uma base nutritiva rica em fatores X e V.³⁹

e) Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol

O meio Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol (SGC) é um meio seletivo utilizado para o isolamento de leveduras e fungos filamentosos a partir de amostras polimicrobianas. A adição de peptonas e de dextrose no meio e a presença de pH ligeiramente ácido, favorecem o crescimento das estirpes fúngicas. Por outro lado, o meio também é seletivo devido à adição de gentamicina, o que inibe o crescimento da maioria das bactérias de GN e de GP, e para além disso, o cloranfenicol melhora a seletividade para espécies resistentes à gentamicina, como por exemplo, *Proteus* spp.⁴⁰

f) Gelose chromID Salmonella Elite

O meio de Gelose chromID Salmonella Elite (SALM) é um meio cromogénico para o isolamento e identificação seletiva de *Salmonella* em amostras de fezes. O meio é constituído por uma base nutritiva com peptonas e substratos cromogénicos que permite o crescimento de todas as estirpes de *Salmonella* e a revelação das atividades enzimáticas correspondentes. Estirpes *Salmonella* fermentadoras de lactose têm colónias de cor malva pálida a malva e para estirpes não fermentadoras de lactose não têm cor com centro negro. Por fim, a mistura nutritiva permite inibir bactérias de GP, algumas de GN e fungos.⁴¹

g) Gelose XLD

O meio Gelose Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) é um meio para o isolamento seletivo e de diferenciação de bactérias dos gêneros *Salmonella* e *Shigella* a partir de amostras de fezes. O meio é constituído por desoxicolato de sódio que vai inibir o crescimento da maioria das bactérias não patogênicas. A presença de colónias amarelas ou laranjas no meio significa que houve crescimento bacteriano e fermentação de um dos três açúcares, a lactose, a sacarose ou a xilose. Por outro lado, a presença de colónias rosas ou vermelhas com ou sem centro negro é característico de *Salmonella* ou *Shigella*. No entanto, a maioria das estirpes de *Salmonella* produz sulfeto de hidrogênio (H₂S) a partir do tiosulfato de sódio e as colónias com centro preto, possibilitando a diferenciação entre *Salmonella* e *Shigella*. Por último, os microrganismos que contêm a enzima descarboxilase originam colónias vermelhas por descarboxilação da lisina.³⁵

h) Gelose Chapman

O meio de gelose Chapman (MSA2) é um meio seletivo destinado ao isolamento de bactérias pertencentes ao género *Staphylococcus* em amostras biológicas. A adição de uma elevada concentração de cloreto de sódio, inibe o crescimento de algumas bactérias que não os *Staphylococcus*. No seguinte meio, a observação de colónias amarelas deve-se ao facto dos microrganismos fermentarem o manitol presente no meio, permitindo a identificação de *S. aureus*. Por outro lado, se não houver mudança de cor do meio, o microrganismo presente não fermenta o manitol.⁴²

i) Gelose Mac Conkey

O meio Gelose Mac Conkey (MCK) é um meio de isolamento seletivo e diferencial para enterobactérias a partir de amostras biológicas. Os sais biliares e o cristal violeta inibem o crescimento da maioria das bactérias de GP e de GN fastidiosas, como *Neisseria*, tornando o meio seletivo. Por outro lado, a presença de lactose no meio, permite que o meio seja diferencial, pelo facto de microrganismos fermentadores de lactose permitirem a viragem do vermelho neutro, isto é, originam colónias cor-de-rosa a vermelho, por vezes rodeadas por um precipitado de sais biliares e os microrganismos não fermentadores da lactose originam colónias incolores ou de tom amarelado.³⁸

j) Gelose Campyloset

O meio Gelose Campyloset (CAM) é um meio seletivo que permite o isolamento de *Campylobacter* intestinal, principalmente, *C. jejuni* e *C. coli* a partir de amostras de fezes. O meio é constituído por sangue de carneiro que vai permitir o crescimento da espécie pretendida e por antibióticos e antifúngicos que inibem o crescimento da maioria dos contaminantes. As colónias são pequenas e acinzentadas, mas esta identificação deve ser confirmada com o exame direto da amostra que apresenta motilidade característica.⁴³

k) Gelose chromID Strepto B

O meio Gelose chromID Strepto B (STRB) é um meio cromogénico seletivo utilizado para a deteção de *S. agalactiae* em exsudados vaginais e vaginais/retais de mulheres grávidas e em recém-nascidos. O seguinte meio é constituído por uma base nutritiva que contém uma mistura de peptonas, três substratos cromogénicos e antibióticos. A observação de colónias de cor rosa pálido a vermelho é indicativo de *S. agalactiae*, uma vez que a maioria de outras espécies de bactérias e leveduras não se desenvolvem no presente meio ou não formam colónias características.⁴⁴

l) Gelose Mueller Hinton E

O meio de Gelose Mueller Hinton E (MHE) é utilizado para testes de sensibilidade aos antibióticos, através da realização de métodos por difusão em disco e determinação da CMI. A composição do meio permite o crescimento das bactérias não fastidiosas, tais como enterobactérias, bacilos de GN não fermentadores, estafilococos e enterococos, constituindo um meio não seletivo.³⁵

m) Caldo Todd Hewitt com Antibióticos

O caldo Todd Hewitt com antibióticos (Todd H-T) é um meio líquido de enriquecimento seletivo para o crescimento de estreptococos do grupo B em amostras de mulheres grávidas. Para além disso, também é utilizado para o rastreio de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA). O meio é constituído por antibióticos, tais como ácido nalidíxico e colistina, os quais inibem crescimento da maioria dos microrganismos de GN presentes na microbiota. Após a etapa de enriquecimento, é realizada a repicagem para outros meios destinados à deteção de estreptococos.⁴⁵

n) Caldo Cérebro-coração

O caldo Cérebro-coração (BHI-T) é um meio líquido, composto com uma base nutritiva que permite o desenvolvimento de microrganismos aeróbios fastidiosos. Após a incubação, se ocorrer crescimento bacteriano observa-se turvação no meio e de seguida é realizada a repicagem para o meio apropriado.³⁵

o) Caldo Selenito F (Selenito F-T)

O caldo Selenito F (SELENITO F-T) é um meio líquido de enriquecimento para *Salmonella* a partir de amostras de fezes, que favorece o crescimento deste género a partir de uma amostra polimicrobiana. Após a etapa de enriquecimento, é feita a repicagem para outros meios que estão destinados à deteção de *Salmonella*.⁴⁶