



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Juliana Marques Simões

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 pelo Dr. Carlos Cortes e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Juliana Marques Simões

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 pelo Dr. Carlos Cortes e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Outubro de 2021

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que fizeram parte desta etapa da minha vida e que nunca me deixaram desistir.

Aos meus pais, por terem estado sempre comigo ao longo desta caminhada, principalmente à minha mãe que sempre me deu força para que não desistisse e sempre me disse que era capaz, só tinha que acreditar em mim.

Às minhas irmãs por toda a compreensão e apoio que demonstraram.

Ao David por toda a paciência que teve de ter comigo ao longo dos últimos anos e por todo o carinho demonstrado.

A todos os meus colegas de mestrado, por toda a troca de apoio e sabedoria, por todos os momentos partilhados.

Aos Professores do Mestrado em Análises Clínicas, por toda a aprendizagem transmitida, especialmente à Professora Doutora Sara Margarida dos Santos Domingues pela orientação no Relatório de estágio.

Ao Centro Hospitalar Médio Tejo – Unidade Hospitalar de Tomar, por me terem recebido tão bem e por todo o conhecimento que me transmitiram durante os cinco meses de estágio. Um especial agradecimento ao Dr. Jóni Mota que ao longo do estágio me concedeu a oportunidade de acompanhar a validação de diversos casos clínicos.

Índice

Agradecimentos.....	5
Índice de Figuras.....	9
Índice de Tabelas.....	10
Resumo.....	15
Abstract.....	15
1. Introdução.....	17
2. Caracterização do laboratório.....	17
2.1 Fase pré-analítica.....	18
2.1.1 Sala de colheitas.....	18
2.1.2 Receção de produtos.....	19
2.2 Fase analítica.....	19
2.3 Fase pós-analítica.....	19
3. Microbiologia.....	19
3.1 Equipamentos.....	20
3.1.1 IVD MALDI Biotyper.....	20
3.1.2 Vitek 2 Compact.....	21
3.1.3 GeneXpert.....	22
3.1.4 FilmArray.....	23
3.1.5 Bactec 9120.....	24
3.1.6 Bactec Mgit 960.....	24
3.2 Bacteriologia.....	24
3.2.1 Colorações.....	24
3.2.2 Meios de cultura.....	25
3.2.3 Técnicas de sementeira.....	27
3.3 Análises efetuadas.....	28
3.3.1 Urina.....	28
3.3.2 Sangue (Hemocultura).....	29
3.3.3 Fezes.....	30
3.3.4 Líquidos serosos.....	31
3.3.5 Secreções respiratórias.....	32
3.3.6 Exsudados/coleções purulentas.....	32
3.3.7 Ponta de cateter.....	33
3.3.8 Medula óssea e Líquido Cefaloraquídeo.....	33
3.4 Teste de sensibilidade à optoquina.....	34
3.5 Teste de suscetibilidade antimicrobiana manual.....	34
3.6 Teste rápido para a deteção de carbapenemases.....	35
3.7 Teste de suscetibilidade à colistina.....	35
3.8 Parasitologia.....	36
3.8.1 Pesquisa de antígeno de <i>Giardia lamblia</i> / <i>Cryptosporidium parvum</i> / <i>Entamoeba histolytica</i>	36
3.8.2 Kit de concentração de ovos/parasitas fecais.....	37

3.8.3	Pesquisa de ovos de <i>Enterobius vermicularis</i>	37
3.9	Micobacteriologia	37
3.9.1	Teste rápido de identificação de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	39
3.9.2	Teste da sensibilidade antimicobacteriana de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	39
3.10	Validação	39
3.11	Controlo de Qualidade	41
3.11.1	Controlo de Qualidade Interno.....	41
3.11.2	Avaliação externa da Qualidade	41
3.12	Casos Clínicos	42
4.	Hematologia	44
4.1	Produtos	44
4.1.1	Sangue	44
4.1.2	Líquidos Biológicos.....	44
4.2	Colheita de amostras	45
4.3	Equipamentos	45
4.3.1	Sysmex XN-1000	45
4.3.2	Test I THL.....	48
4.3.3	Arkray Adams™ A1c HA-8160.....	48
4.3.4	Hydrasis.....	49
4.4.	Análises efetuadas	49
4.4.1	Hemograma.....	49
4.4.2	Leucograma	51
4.4.3	Plaquetograma.....	51
4.4.4	Esfregaço de sangue periférico	51
4.5	Hemostase	58
4.5.1	Equipamento (ACL TOP 300 E 500)	59
4.5.2	Análises efetuadas	60
4.6	Validação	62
4.7	Controlo de Qualidade	63
4.7.1	Controlo de Qualidade interno.....	63
4.7.2	Avaliação externa da Qualidade	63
4.8	Casos Clínicos	64
5.	Imunologia e Bioquímica	68
5.1	Metodologias	68
5.1.1	Potenciometria.....	68
5.1.2	Nefelometria e Turbidimetria.....	68
5.1.3	Imunoensaios.....	69
5.	Caso Clínico	70
6.	Conclusão	71
	Referências Bibliográficas	73

Índice de Figuras

Figura 1. Meio com cisteína, lactose e deficiente em eletrólitos (CLED) com colónias de <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Escherichia coli</i>	29
Figura 2. Meio Gelose de sangue com colónias de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i>	30
Figura 3. Meio Yersinia com colónias de <i>Yersinia</i> e <i>Salmonella</i>	31
Figura 4. Teste de sensibilidade aos antibióticos manual em meio de Mueller-Hinton.....	35
Figura 5. Teste da suscetibilidade da bactéria ao antibiótico.....	36
Figura 6. Imagem microscópica do esfregaço	42
Figura 7. Meio de Hektoen com colónias de <i>Salmonella</i> sp.	43
Figura 8. Como executar e execução um esfregaço de sangue periférico.....	51
Figura 9. Imagem microscópica do esfregaço de sangue periférico.....	65
Figura 10. Imagem microscópica do esfregaço de sangue periférico.....	66
Figura 11. Imagem microscópica do esfregaço de sangue periférico.....	67
Figura 12. Gráfico da eletroforese das hemoglobinas	68

Índice de Tabelas

Tabela 1. Meios utilizados no SPC e os seus princípios	25
Tabela 2. Erros que podem ocorrer pré, durante e após a colheita.....	45
Tabela 3. Parâmetros hematológicos e respetivas metodologias.....	46
Tabela 4. Alterações na série vermelha e as principais causas.....	52
Tabela 5. Alterações na série branca e as principais causas.....	55
Tabela 6. Alterações na série plaquetas e as principais causas.....	57
Tabela 7. Resultados das análises laboratoriais.....	64
Tabela 8. Resultados das análises laboratoriais	65
Tabela 9. Resultados das análises laboratoriais	67
Tabela 10. Resultados das análises laboratoriais.....	71

Abreviaturas

AEQ – Avaliação externa da qualidade

BAAR – Bacilos ácido-álcool resistentes

BHI – Caldo cérebro-coração *do inglês brain-heart infusion*

BK – Bacilo de Koch

CAMPY – Gelose Campyloset

Carba-R – Resistência a carbapenemos

CHMT – Centro Hospitalar Médio Tejo

CID – Coagulação intravascular disseminada

CLED – Cistina, lactose, défice em eletrólitos

CMHG – Hemoglobina corpuscular média *do inglês mean corpuscular hemoglobin concentration*

CQE – Controlo de Qualidade Externo

CQI – Controlo de Qualidade Interno

DNA – Ácido desoxirribonucleico *do inglês deoxyribonucleic acid*

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético *do inglês ethylenediamine tetraacetic acid*

ESP – Esfregaço de sangue periférico

EUCAST – Comité Europeu de Avaliação de Suscetibilidade Antimicrobiana *do inglês European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

Flu/RSV – Vírus da Gripe A e B/ vírus respiratório sincicial

FT – Fator tecidual

FvW – Fator de vonWillebrand

GS – Gelose de Sangue

HAE – Gelose *Haemophilus* spp.

HbA₁ – Hemoglobina alfa 1

HbA_{1c} – Hemoglobina glicada

HbA₂ – Hemoglobina alfa 2

HCT – Hematócrito

HEK – Hektoen

Hg – Hemoglobina

HGM – Hemoglobina globular média

HPV – Vírus papiloma humano *do inglês human papilloma virus*

INR – Razão internacional normalizada *do inglês International normalized ratio*

INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

LCR – Líquido Cefaloraquídeo

MAC – Gelose MacConkey
MIN – Minutos
MPC – Médico Patologista Clínico
MRSA – *Staphylococcus aureus* meticilina resistente *do inglês Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*
MRSM – *Staphylococcus aureus* meticilina resistente smart
MTB – *Mycobacterium tuberculosis*
PC – Proteína C
PCa – Proteína C ativada
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PNAEQ-INSA – Programa Nacional da Avaliação Externa da Qualidade do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
PS – Proteína S
PTT – Púrpura trombocipénica trombótica
PVX – Polyvitex
RDW – Coeficiente de dispersão eritrocitária *do inglês Red cell distribution width*
RIQAS – Esquema Internacional de Avaliação da Qualidade da Randox *do inglês Randox International Quality Assessment Scheme*
RNA – Ácido ribonucleico *do inglês ribonucleic acid*
RPM – Rotações por minuto
SGC – Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol
SHU – Síndrome hemolítico-urémica
SLS – Sulfato Lauril de Sódio
SPC – Serviço de Patologia Clínica
SU – Serviço de Urgência
TAC – Tomografia computadorizada
TIBC – Capacidade total de fixação do ferro *do inglês total iron binding capacity*
TP – Tempo protrombina
TPE – Transtorno de personalidade esquizoide
TSA – Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos
TSS – Técnico Superior de Saúde
TT – Tempo trombina
TTPA – Tempo de tromboplastina ativada
TVP – Trombose venosa profunda
UFC – Unidades Formadoras de Colónias

UK-NEQAS – Esquema Nacional de Avaliação de Qualidade Externa do Reino Unido *do inglês* United Kingdom National External Quality Assessment Service

VCAT – Vancomicina, Colistina, Anfotericina, Trimetroprim

YER – Gelose *Yersinia* spp.

Resumo

No presente relatório de estágio curricular realizado, no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Médio Tejo – Unidade Hospitalar de Tomar, pretende-se descrever toda a aprendizagem adquirida.

O estágio englobou as diferentes áreas analíticas, nomeadamente a Hematologia, Bioquímica, Imunologia e Microbiologia, sendo que irá ser feita uma abordagem mais sucinta das áreas de Bioquímica e Imunologia e uma mais detalhada na área de Microbiologia e Hematologia.

Este relatório dispõe ainda da discussão de casos clínicos que foram surgindo ao longo do estágio curricular.

Palavra-chave: Microbiologia, Hematologia, Bioquímica, Análises Clínicas, Centro Hospitalar Médio Tejo.

Abstract

In the present report of the curricular internship, carried out within the scope of the Master's Degree in Clinical Analyses of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra in the Clinical Pathology Service of the Centro Hospitalar Médio Tejo– Unidade Hospitalar de Tomar, it is intended to describe all the acquired knowledge.

The internship included the different analytical areas, namely Hematology, Biochemistry, Immunology and Microbiology. A succinct approach will be done in the areas of Biochemistry and Immunology and a more detailed one in the area of Microbiology and Hematology.

This report also includes the discussion of clinical cases that arose during curricular internship.

Keywords: Microbiology, Hematology, Biochemistry, Clinical Analyses, Centro Hospitalar Médio Tejo

1. Introdução

O Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra tem como objetivo conferir uma aprendizagem multifacetada e especializada na área do diagnóstico laboratorial. Este Mestrado contém no seu plano de estudos um estágio curricular que visa consolidar todo o conhecimento obtido ao longo do mestrado e conhecer toda a dinâmica de um laboratório de Análises Clínicas.

O presente relatório de estágio é relativo ao estágio realizado no Serviço de Patologia Clínica (SPC) Do Centro Hospitalar Médio Tejo (CHMT) – Unidade do Hospital de Tomar sob orientação do Dr. Carlos Cortes, onde tive a oportunidade de estar nas quatro áreas pretendidas (Microbiologia, Hematologia, Bioquímica e Imunologia) e também acompanhei toda a fase pré-analítica desde a colheita à receção da amostra e a fase pós-analítica.

O tempo de estágio foi dividido pelas quatro secções de modo a permanecer cerca de um mês em cada uma das áreas.

Este relatório debruça-se essencialmente sobre a componente prática e teórica das áreas de Microbiologia e Hematologia contendo casos clínicos que foram surgindo ao longo dos cinco meses de estágio, é ainda feita uma abordagem mais sucinta das áreas de Imunologia e Bioquímica, assim como da fase pré-analítica e controlo de Qualidade.

2. Caracterização do laboratório

O CHMT é constituído por três Unidades Hospitalares localizadas em Abrantes (Hospital Doutor Manoel Constâncio), Tomar (Hospital Nossa Senhora da Graça) e Torres Novas (Hospital Rainha Santa Isabel).

O SPC do CHMT – Unidade Hospitalar de Tomar está situado na Avenida Maria de Lurdes de Mello Castro, 2304-909 Tomar.

Na unidade de Tomar está centralizado o laboratório de Patologia Clínica, no entanto, existem laboratórios de urgência e apoio à rotina dos internamentos nas Unidades de Abrantes e Torres Novas. Além da realização de análises urgentes é disponibilizado, todos os dias úteis, aos utentes das consultas externas e a qualquer utente externo ao laboratório, um horário de colheita de amostras. A receção e envio ao Laboratório Central é da responsabilidade do Laboratório de cada Unidade, com as devidas condições de identificação, segurança e temperatura.

Os parâmetros analíticos menos frequentes ou mais diferenciados são enviados para Laboratórios externos, sendo que é sempre necessário a identificação do utente, número do

processo e acondicionamento em sistemas de transporte próprios de maneira a ser assegurada a integrabilidade da amostra.

O SPC é composto pelos setores de Microbiologia, Hematologia, Bioquímica e Imunologia, sendo que o setor de Bioquímica e Imunologia estão agrupados designando-se Imunoquímica. O SPC está informatizado com um sistema de gestão laboratorial – ModuLab – que permite gerir todos os pedidos de análises que chegam ao laboratório e garantir a rastreabilidade dos mesmos, desde o pedido de análise efetuado pelo médico até à validação final de todos os parâmetros.

Este serviço está certificado pela Norma NP EN ISSO 9001:2015, tem um programa de Controlo de Qualidade Interno (CQI) e participa em Programas de Avaliação Externa da Qualidade, permitindo assim uma melhoria continua.

A direção do SPC está a cargo do Dr. Carlos Cortes e é constituído por 5 Técnicos Superior de Saúde (TSS) , 4 Médico Patologista Clínico (MPC), 7 Médicos internos de formação específica em Patologia Clínica, 61 Técnicos Superior de Saúde e Diagnóstico (TSDT), 5 assistentes operacionais.

2.1 Fase pré-analítica

2.1.1 Sala de colheitas

Iniciei o estágio na sala de colheitas associada à patologia COVID-19 onde tive a oportunidade de aprender todo o procedimento desde a colocação do equipamento de proteção individual à colheita. Na colheita, o primeiro passo é sempre confirmar a presença de todo o material necessário. De seguida confirmar a identidade do utente e só depois proceder à recolha de células da fossa nasal e posteriormente da orofaringe. Surgiu a oportunidade de ir conhecer as enfermarias da COVID-19 da Unidade Hospitalar de Abrantes, onde tive a oportunidade de compreender toda a logística associada.

A colheita de sangue é realizada pela técnica de vácuo o que é bastante vantajoso, uma vez que, o sangue é colhido diretamente para o tubo coletor. Assim, diminui uma possível contaminação e minimiza a exposição ao sangue do utente. A quantidade de sangue a colher depende das análises pedidas, sendo que para uma boa qualidade dos resultados é essencial respeitar a marca de enchimento nos tubos com anticoagulantes.

2.1.2 Receção de produtos

Nesta fase pré-analítica a receção das amostras é efetuada através do código de barras. É sempre necessário ter em consideração o estado de amostra, sendo que poderá solicitar-se uma nova colheita através do sistema Modulab, caso a amostra não esteja conforme.

Existem diversos aspetos que podem causar interferências analíticas tais como a hemólise de uma amostra, turvação do soro, amostra coagulada, ou proporção não respeitada de sangue-anticoagulante.

Uma amostra que se apresente hemolisada pode levar ao aumento de determinados parâmetros analíticos ou interferência na leitura por absorvância; a interferência varia conforme o grau apresentado de hemólise. A coagulação de uma amostra normalmente acontece quando se trata de uma colheita mais difícil ou devido à falta de homogeneização da amostra após a colheita. É também essencial fazer colheita do volume certo de amostra, devendo-se respeitar a marca que o tubo apresenta.

2.2 Fase analítica

A fase analítica é composta pelo processamento das diversas amostras, que é iniciado após as manutenções necessárias a cada aparelho e os respetivos controlos. É essencial a compreensão das várias metodologias utilizadas em cada analisador para a obtenção de resultados fidedignos.

2.3 Fase pós-analítica

A fase pós-analítica é constituída pela validação do resultado após todos os parâmetros determinados estarem disponíveis no sistema informático, tendo em consideração a história clínica do doente. A validação é efetuada pelos MPC e TSS.

As amostras são armazenadas nos respetivos suportes por um equipamento de forma a agilizar a procura do tubo caso seja necessário repetir alguma análise.

3. Microbiologia

O setor de microbiologia é composto por duas salas distintas. Uma onde é realizado todo o processo desde a receção de amostras até à sua identificação e validação e outra onde se trata exclusivamente os pedidos de pesquisa de bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR) e pesquisa de determinado agente patogénico através do GeneXpert.

Ao receber os produtos, que chegam ao laboratório no setor de microbiologia, é crucial rejeitar todas as amostras que não vêm no meio de transporte adequado ou que estão vertidas. Todos os critérios que possam levar a uma rejeição da amostra são aplicados. Depois desta ser recebida é essencial verificar o pedido da amostra, uma vez que pode ser necessário efetuar mais algum procedimento que não estava apresentado nas etiquetas que acompanham o contentor da amostra.

De seguida, são impressas as etiquetas de identificação dos meios de cultura. No início do processamento da amostra devemos ter especial atenção aos produtos que não estão em meio de transporte, estes devem ser tratados com a maior brevidade possível.

3.1 Equipamentos

Em termos de equipamentos, este setor é constituído por 3 câmaras de fluxo laminar, 4 estufas (três a 37°C, uma para as garrafas de hemocultura positivas, outra com 5% CO₂ e ainda uma para guardar todos os produtos processados; uma 25°C para os fungos), um aparelho de identificação bacteriana (IVD MALDI Biotyper), um aparelho de coloração automática (AeroSpray), um aparelho para a realização do antibiograma, embora também possa realizar a identificação (Vitek 2 compact), um equipamento para hemoculturas (Bactec 9120), um equipamento para a cultura de BAAR (Bactec Mgit 960), um equipamento para a realização de análises por reação em cadeia da polimerase (PCR) (GeneXpert) e ainda um sistema de PCR multiplex (FilmArray).

3.1.1 IVD MALDI Biotyper

O IVD MALDI Biotyper utiliza um método com base na espetrometria de massa para a deteção de microrganismos através de uma biblioteca de referência. A espetrometria de massa é composta por três unidades funcionais. Uma fonte de iões para ionizar e transferir para uma fase gasosa, um analisador de massa que separa os iões de acordo com a sua razão massa-carga e um dispositivo de deteção dos iões separados.

Os microrganismos são identificados a partir das culturas da amostra biológica e é na bandeja que é colocada a colónia a identificar numa posição selecionada. A bandeja é deixada ao ar para todo o material biológico secar e posteriormente é adicionada a matriz que contém solvente padrão capaz de extrair proteínas, existentes em elevadas quantidades, dos microrganismos presentes. Quando a matriz estiver seca, a bandeja estará pronta para entrar no equipamento.

Todas as posições da bandeja são analisadas por espectrometria de massa, onde o alvo é bombardeado com breves impulsos de laser. É através das proteínas mais abundantes que resulta um espectro de massa com características específicas de cada espécie podendo ser usado como uma “impressão digital molecular”, permitindo, deste modo, identificar o microrganismo presente em determinada amostra. [1]

3.1.2 Vitek 2 Compact

O Vitek 2 Compact tem capacidade para realizar a identificação e antibiograma através de cartas de identificação com características específicas para determinada bactéria. Estas cartas são colocadas numa cassete que tem capacidade para 15 cartas com os respetivos tubos do inóculo. O procedimento inicial está descrito no diagrama I. No laboratório, este aparelho é utilizado maioritariamente para a realização de teste de suscetibilidade antimicrobiana (TSA). O equipamento regista a concentração mínima inibitória (CMI) para cada fármaco através de um sistema ótico que usa diferentes comprimentos de onda na zona do visível para realizar as leituras turbidimétricas e colorimétricas. Este equipamento interpreta os resultados com base nas regras da Comité Europeu de Avaliação de Suscetibilidade Antimicrobiana (EUCAST), sendo possível determinar se a bactéria presente é resistente ou sensível a determinado antimicrobiano.[2]

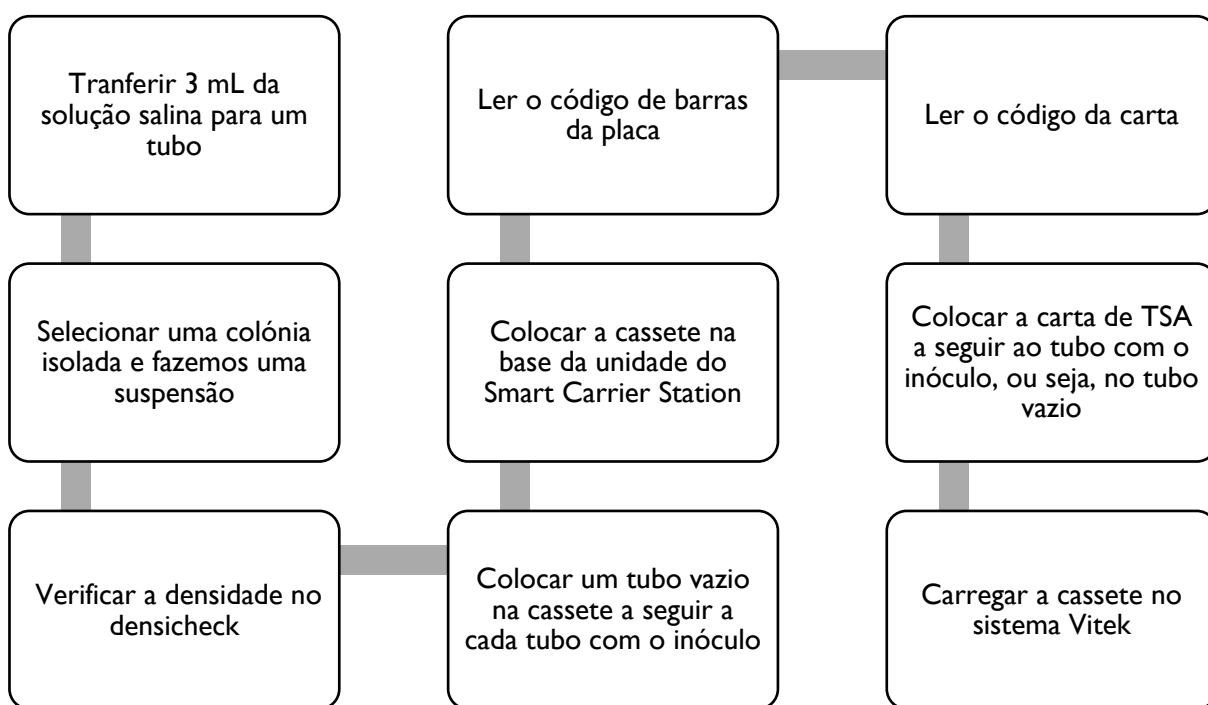


Diagrama I – Programação do Vitek 2 Compact

3.1.3 GeneXpert

O sistema GeneXpert automatiza e integra a preparação de amostras, extração, amplificação de ácidos nucleicos e a detecção da sequência alvo em amostras através de ensaios de PCR em tempo real. Este sistema é constituído pelo instrumento, computador e um software pré-carregado que permite execução de testes e a visualização dos resultados. Os reagentes de PCR estão nos cartuchos descartáveis onde irá ocorrer a reação, cada cartucho é de utilização única diminuindo a possibilidade de contaminação cruzada entre amostras.

Este sistema dispõe de técnicas de Biologia Molecular para a detecção de bactérias produtoras de carbapenemases (Carba-R), *Clostridioides difficile*, vírus da gripe A e B/ vírus respiratório sincicial (Flu/RSV), vírus do papiloma humano (HPV), *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA), *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) e enterococos resistentes à vancomicina A e B (VanA/VanB).

- Carba-R

O ensaio Xpert Carba-R é um teste qualitativo destinado à detecção e distinção de determinadas sequências genéticas que estão associadas à não suscetibilidade a carbapenemos. A amostra utilizada é uma zaragatoa retal e perineal.

- *Clostridioides difficile*

Este sistema permite a detecção de *Clostridioides difficile* (gene da toxina B), gene de toxina binária e a deleção de um nucleótido na posição 117 a partir de amostras fecais líquidas. O fator de risco mais comum associado ao *Clostridioides difficile* é a exposição constante a antibióticos.

- Flu/RSV

Este é um ensaio em PCR automatizado em tempo real que permite a distinção do RNA viral do RSV e *Influenza*. Nos doentes com sinais e sintomas é colhida uma amostra zaragatoa nasofaríngea e nasal. Os resultados deste teste não devem ser usados como única base para o tratamento.

- HPV

Xpert HPV Assay é um teste qualitativo utilizado para a detecção da região E6/E7 do genoma do DNA viral proveniente de HPV, através de uma amplificação múltipla do DNA alvo por PCR em tempo real de 14 serotipos de HPV de alto risco. A amostra utilizada para este ensaio são células cervicais.

- MRSA

O ensaio Xpert MRSA NxG é um teste qualitativo que permite a detecção do DNA de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, onde ocorre a amplificação dos alvos específicos do DNA e sondas de hibridação fluorogénicas específicas para os alvos. As amostras são colhidas de zaragoas nasais em doentes com risco de colonização nasal.

- MTB

O ensaio Xpert MT/RIF Ultra, um teste de diagnóstico semi-quantativo, utiliza a PCR em tempo real para a detecção do DNA de MTB em amostras de expectoração não processadas. Caso seja detetado este complexo, este ensaio também permite a detecção de mutações do gene *rpoB* associado a resistência à rifampicina.

- *vanA/vanB*

Este é um ensaio de diagnóstico qualitativo utilizado para a detecção dos genes (*Van A* e *Van B*) associadas à resistência à vancomicina em amostras de zaragoas retais e perianais. O ensaio é utilizado em doentes de risco de colonização intestinal de bactérias resistentes à vancomicina.

3.1.4 FilmArray

Este sistema contém uma bolsa de reagentes específicos onde o equipamento interage permitindo a purificação de ácidos nucleicos e amplificação de sequências alvo presentes na amostra do doente utilizando a PCR multiplex num sistema fechado. Os produtos de PCR gerados são avaliados por análise de fusão de DNA e o software interpreta automaticamente os resultados, disponibilizando-os no Modulab.

O painel gastrointestinal permite a pesquisa de algumas bactérias, vírus e parasitas através de amostras de fezes em meio de transporte Cary-Blair.

No caso de infeções do sistema nervoso central utilizamos o painel meningite/encefalite em que pesquisamos bactérias, vírus e leveduras numa amostra de Líquido Cefalorraquidiano (LCR) (mínimo 200µL).

No painel respiratório superior pesquisamos vírus e bactérias em amostras de secreções respiratórias superiores.

Por fim, o painel sepsis pesquisa bactérias de Gram positivo e negativo, leveduras e genes de resistência a antimicrobianos em amostras de sangue de hemoculturas positivas.

3.1.5 Bactec 9120

Os meios BD BACTEC™ Plus Aerobic/ F Culture Vials e Plus Anaerobic/ F Culture Vials são usados para a cultura aeróbia e anaeróbia e isolamento de bactérias e fungos no sangue e em líquidos biológicos. Neste equipamento, a amostra a ser utilizada, é inoculada dentro de uma ou mais garrafas que contém o meio líquido de soja-caseína digerida. Estes frascos são introduzidos dentro do equipamento e, se existirem microrganismos na amostra, ocorrerá a produção de CO₂ quando estes metabolizarem os substratos presentes no frasco. Este aumento da produção de CO₂ é detetado pelo sensor químico. O sensor é monitorizado pelo instrumento relativamente ao aumento da fluorescência que é proporcional à quantidade de CO₂ produzida pelo microrganismo.^[3]

3.1.6 Bactec Mgit 960

O aparelho Bactec Mgit 960 encontra-se numa sala isolada onde todos os produtos relacionados com a pesquisa de micobactérias são processados.

O tubo indicador de crescimento de micobactérias é constituído por um meio líquido Middlebrook 7H9 modificado que permite o crescimento e deteção de micobactérias. Este tubo também contém um composto fluorescente embebido em silicone que é sensível à presença de oxigénio dissolvido no meio líquido. A concentração inicial de oxigénio dissolvido extingue a emissão proveniente do composto, sendo possível detetar a fluorescência ainda que em pequenas concentrações.

Subsequentemente, através da respiração ativa dos microrganismos o oxigénio vai sendo consumido o que permite que o composto desenvolva fluorescência.

3.2 Bacteriologia

3.2.1 Colorações

O esfregaço corresponde a uma leve camada de produto microbiológico sobre uma lâmina de vidro, sendo este submetido a uma fixação à chama ou por metanol. Posteriormente, é corado para observação ao microscópio.^[4]

A coloração de Gram é uma coloração diferencial, isto é, utiliza dois corantes e permite distinguir grupos de bactérias com base na sua capacidade de retenção desses corantes. As bactérias que retêm o corante violeta de cristal devido à maior espessura da camada peptidoglicano são consideradas Gram positivo, as que possuem uma menor espessura são consideradas Gram negativo e coram de rosa devido ao segundo corante, fucsina.^[4]

As colorações de Gram são efetuadas no AeroSpray que permite uma coloração rápida e automática. A observação ao microscópio permite distinguir a diferente morfologia bacteriana (cocos, bacilos, cocobacilos vibriões e espiroquetas) e o seu agrupamento; no caso de serem cocos (diplococos, tétradas, estafilococos, estreptococos), caso se trate de bacilos (diplobacilos, paliçada, estreptobacilos).

3.2.2 Meios de cultura

Os meios de cultura podem classificar-se em líquidos, sólidos e semi-sólidos (em função da composição em agar). E podem diferenciar-se em meios seletivos, não seletivos e diferenciais. Os meios cromogénicos que permitem a identificação presuntiva de alguns microrganismos, têm como princípio a redução de substratos cromogénicos após um período de incubação de aproximadamente 18-24h, visível no meio de cultura pela sua alteração de cor.

De seguida, apresenta-se a tabela I com a descrição dos meios utilizados.

Tabela I – Meios utilizados no Serviço de Patologia Clínica e os seus princípios.^[5]

Meio	Classificação	Princípio
Caldo cérebro coração (BHI)	Meio líquido, não seletivo	Meio de enriquecimento universal, composto por uma base nutritiva de coração e cérebro.
Selenito	Meio líquido, seletivo	Meio utilizado para enriquecimento e isolamento de espécies de <i>Salmonella</i> spp. e de algumas espécies de <i>Shigella</i> spp.
Gelose Cistina, Lactose, Deficiente em Eletrólitos (CLED)	Meio sólido, seletivo e diferencial	Meio constituído por cistina, lactose e indicador de pH permite diferenciar as bactérias fermentadoras das não fermentadoras da lactose utilizando o indicador azul de bromotimol. As bactérias que fermentam a lactose produzem colónias de cor amarela, por acidificação do meio. As bactérias não fermentadoras da lactose produzem colónias de cor verde, azul ou incolor. Este meio previne a invasão (“swarming”) por <i>Proteus</i> spp. devido ao fraco conteúdo em eletrólitos.
Gelose de Columbia + 5% de Sangue de Carneiro (COS)	Meio sólido, não seletivo	Meio de isolamento complementado com sangue de carneiro que facilita o crescimento da maioria dos microrganismos. A presença de sangue permite a discriminação de hemólise, critério base para a orientação da identificação de algumas bactérias.
Gelose Chocolate PolyViteX (PVX)	Meio sólido, não seletivo	Recomendado para o crescimento de estirpes mais fastidiosas como <i>Neisseria</i> spp., <i>Haemophilus</i> spp. e <i>Streptococcus pneumoniae</i> , entre outras. Este meio é obtido a partir da Gelose de Columbia ao qual foi adicionado sangue de carneiro aquecido a 80°C. Composto por uma base nutritiva enriquecida com os fatores X(Hemina) e V(NAD) fornecidas pela hemoglobina e PolyVitex.

Gelose Chocolate <i>Haemophilus</i> (HAE)	Meio sólido, seletivo	Meio utilizado para o isolamento de diferentes espécies de <i>Haemophilus</i> spp. Este meio é composto por Gelose de Chocolate, sendo que a seletividade é obtida pela combinação de antibióticos que inibem a maioria das bactérias de Gram positivo e das leveduras.
Gelose Chocolate (VCAT)	Meio sólido, seletivo	Meio utilizado para o isolamento de diferentes espécies de <i>Neisseria</i> spp. Este meio é composto por Gelose de Chocolate ao qual foi adicionada uma combinação de antibióticos (Vancomicina, Colistina, Anfotericina B, Trimetoprim) que inibem a maioria das bactérias e leveduras.
Gelose MacConkey (MCK)	Meio sólido, seletivo e diferencial	Meio seletivo para bactérias de Gram negativo através dos sais biliares e cristal violeta. A fermentação da lactose é detetada através da mudança de cor do meio de rosa para vermelho. Bactérias fermentadoras da lactose formam colónias de cor rosa a vermelho, as que não fermentam a lactose as colónias são incolores e o meio muda de cor para amarelo.
Gelose Hektoen (HEK)	Meio sólido, seletivo e diferencial	Permite o isolamento de <i>Salmonella</i> spp. e <i>Shigella</i> spp. Este meio é constituído por lactose, sacarose, salicina, sais biliares, tiosulfato de sódio, citrato férrico amoniacal e os indicadores de pH fucsina ácida e azul de timol. Se os microrganismos fermentarem um dos três açúcares presentes no meio formam colónias rosa ou rosa-amareladas, caso contrário produzem colónias verdes ou verde-azuladas. Este é um meio seletivo para bactérias de Gram negativo devido à presença de sais biliares que impedem o crescimento de bactérias de Gram positivo. Bactérias produtoras de H ₂ S vão formar um precipitado negro no centro devido à presença de tiosulfato de sódio e de citrato férrico amoniacal.
Gelose Campylosel (CAM)	Meio sólido, seletivo	Este meio é recomendado para o isolamento de espécies de <i>Campylobacter</i> spp. a partir de amostras de fezes. Esta seletividade é assegurada por constituintes presentes no meio (agentes antibacterianos, antifúngicos e sangue) que impedem o crescimento da microbiota associada. As colónias características deste tipo de bactéria são acinzentadas e de tamanho reduzido.
<i>Staphylococcus aureus</i> metilina resistente smart (MRSM)	Meio sólido, cromogénico	Este meio cromogénico baseia-se na coloração rosa de colónias que produzem α -glucosidase e resistentes à cefoxitina, permitindo a identificação presuntiva de <i>Staphylococcus aureus</i> metilina resistente (MRSA)
Gelose chromID™ Strepto B (STRB)	Meio sólido, cromogénico e diferencial	Este meio permite a identificação presuntiva de <i>Streptococcus agalactiae</i> (Grupo B) graças à presença de três substratos cromogénicos. Após a incubação de 18-24 horas ocorre a formação de colónias cor de rosa claro a vermelho, redondas e em forma de pérola.
Gelose de Sabouraud com cloranfenicol (SGC2)	Meio sólido, seletivo	Meio constituído com gentamicina e cloranfenicol que inibe o crescimento bacteriano, permitindo o isolamento de leveduras e fungos a partir de amostras polimicrobianas. O crescimento é favorecido pela

		acidificação do meio e aumento do nível de peptonas e dextrose.
Gelose chromID™ Candida (CAN 2)	Meio sólido, cromogénico	Meio cromogénico que permite o isolamento seletivo de fungos leveduriformes e identificação de espécies de <i>Candida albicans</i> que, pela hidrólise de um substrato cromogénico de hexosaminidase, apresentam uma coloração azul.
Gelose Yersinia (YER)	Meio sólido, seletivo	Este meio é constituído por violeta de cristal, Irgasan, sais biliares, entre outros constituintes que inibem o desenvolvimento das bactérias de Gram positivo e bactérias Gram negativo. As peptonas presentes fornecem os nutrientes necessários ao crescimento de <i>Yersinia</i> spp. A capacidade de fermentação do manitol induz a acidificação do meio dando origem a uma coloração vermelha no centro da colónia graças ao indicador vermelho neutro.
Meio Mueller Hinton	Meio utilizado para o teste de suscetibilidade antimicrobiana (TSA) manual	Este é meio possui uma baixa concentração de timina e timidina e contém cálcio, magnésio, proteínas e carboidratos que proporcionam o crescimento bacteriano.

3.2.3 Técnicas de sementeira

As técnicas que usamos no laboratório são a sementeira por quadrantes, por espalhamento com zaragatoa, para quantificação de colónias e por Método de Maki. Os meios são semeados do menos seletivo para o mais.^[5]

A técnica mais utilizada no laboratório é a sementeira por quadrantes, que tem como objetivo a obtenção de colónias isoladas e para isso é essencial não cruzar as estrias de modo a reduzir o inóculo de cada estria. Para os meios cromogénicos ChromID MRSA e ChromID Strepto B é usada a sementeira por espalhamento com zaragatoa pois o objetivo é perceber se o microrganismo está presente ou não. No laboratório, a urina é semeada com o objetivo de quantificação de microrganismos e é usado uma ansa de diâmetro calibrado (1µL). A sementeira pelo Método de Maki é usada para as pontas de cateter. Com o auxílio de uma pinça previamente esterilizada colocamos o cateter na superfície do meio e rolamos por toda a superfície do meio, pelo menos duas vezes; é essencial que o cateter role sobre o meio e não seja esfregado caso contrário a obtenção de colónias isoladas é dificultada.^[5]

3.3 Análises efetuadas

3.3.1 Urina

As infeções do trato urinário são das mais comuns em todo o mundo e podem ocorrer a nível do trato urinário inferior designando-se por cistite (bexiga) ou podem ocorrer a nível do trato urinário superior e aí são designadas por pielonefrites (parênquima renal). Em ambas as situações o agente etiológico mais comum é a enterobactéria *Escherichia coli* sendo o sexo feminino o mais afetado devido aos fluidos prostáticos, ao baixo pH, à elevada osmolaridade da urina e à anatomia do trato urinário.^[5]

É necessário explicar sempre ao utente como proceder à colheita para a urocultura e de preferência devemos dar um panfleto ilustrativo com a explicação. A colheita deverá ser feita na primeira urina da manhã depois de uma correta higienização, rejeitando sempre a primeira porção, recolhendo para um contentor estéril o jato intermédio da urina, rejeitando também a última porção. Depois da amostra ser entregue no serviço esta deverá ser processada o mais rapidamente possível. Nas amostras de outras Unidades Hospitalares que necessitam de serem transportadas até à Unidade Hospitalar de Tomar, estas são colocadas em meio de transporte (ácido bórico) de modo a permitir a conservação da amostra.

Na chegada das amostras ao laboratório é realizada a urocultura, que consiste na quantificação dos microrganismos presentes na urina, e a urina tipo II (sumária de urina) onde se avaliam os parâmetros bioquímicos e o sedimento urinário. A análise sumária de urina é realizada no equipamento Aution Max AX42-80 e o sedimento no sediMAX.

As urinas são semeadas em meio CLED, para a quantificação de microrganismos. No caso de se tratarem de mulheres em fase gestacional e em casos em que a colheita foi realizada por punção supra-púbica, o meio de gelose de sangue (GS) também é semeado. Na grávida vai permitir detetar o crescimento de *Streptococcus agalactiae* e na punção supra-púbica é utilizado por uma questão de segurança, uma vez que, qualquer microrganismo que cresça nesta amostra deverá ser valorizado. A Figura 1 representa bactérias fermentadoras da lactose no meio CLED.

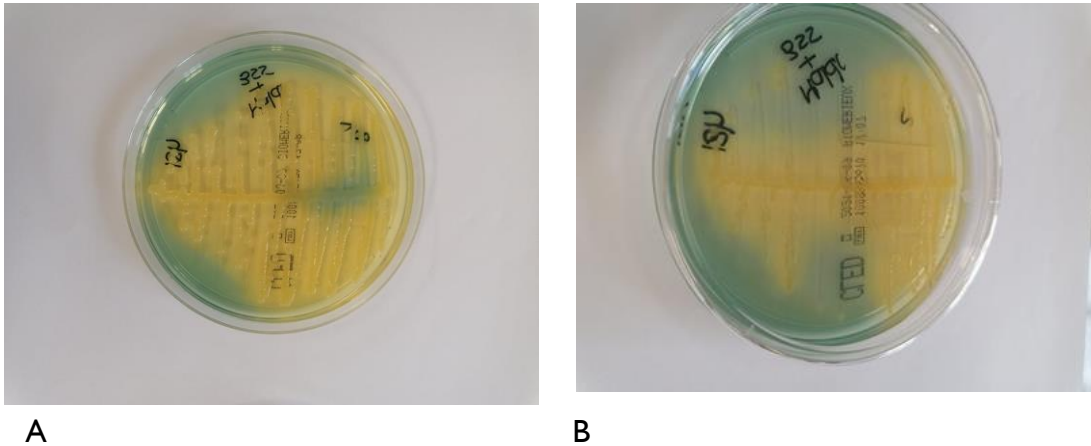


Figura 1: A e B - Bactérias fermentadoras da lactose no meio Cistina, lactose deficiente em eletrólitos (Fonte: SPC Tomar).

3.3.2 Sangue (Hemocultura)

A colheita de sangue é efetuada por punção venosa e normalmente são colhidas quatro garrafas de membros diferentes. Nas hemoculturas temos de ter em atenção o volume de amostra, porque na maioria das bacteriemias a concentração de microrganismos presentes tende a ser baixa, principalmente se o doente estiver sob efeito da terapêutica. Nas crianças é necessário um menor volume de sangue (1 a 5 mL) e nos adultos um maior volume de sangue (10 a 30 mL).^[5] A amostra é inoculada em garrafas de hemocultura, havendo garrafas para cultura de microrganismos aeróbios em que o meio contém na sua composição O_2 e garrafas para cultura de microrganismos anaeróbios CO_2 . Ambas as garrafas são constituídas com um meio enriquecido com caldo de soja e caseína.

As hemoculturas que provém da respetiva unidade, depois de recebidas são colocadas no aparelho de incubação Bactec 9120. Nas que chegam positivas das outras unidades hospitalares é realizada uma sementeira em meio Gelose de sangue (GS), que por ser um meio não seletivo e devido à presença de sangue permite a discriminação de hemólise. De seguida é necessário realizar uma coloração de Gram que nos irá indicar a morfologia do microrganismo. Na Figura 2 podem ser observadas duas espécies bacterianas distintas no meio GS.



A



B

Figura 2: Gelose de sangue com colônias de A - *Staphylococcus aureus*; B - *Klebsiella pneumoniae*. (Fonte: SPC Tomar)

3.3.3 Fezes

Os microrganismos responsáveis por infecções gastrointestinais têm vindo a modificar-se devido a viagens intercontinentais, medicação, exposição a outras pessoas com sintomatologia semelhante e o desenvolvimento de novas técnicas mais sensíveis de diagnóstico. A população mais afetada por este tipo de infeção são as crianças e idosos, sendo através da história, avaliação clínica, exame físico, análises efetuadas às fezes, viagens recentes e dos alimentos ingeridos que o médico faz uma avaliação da infeção.

A maioria das amostras que nos chegam ao laboratório, são de outras unidades hospitalares e vêm colhidas em zaragatoas, em meio de transporte Cary-Blair, com resultado negativo para *Campylobacter* spp.. Inicialmente, caso o produto seja da própria unidade hospitalar, é enviada a amostra num recipiente estéril. É efetuada a pesquisa do antigénio de *Campylobacter* spp. através de um teste rápido; caso este seja positivo, além de semearmos a nossa amostra nos meios de MacConkey (MCK), Hektoen (HKT), Yersinia (YER) e caldo de selenito, também temos de semear no meio Campyloset (CAMPY) e GS como abaixo descrito.

O RIDA QUICK é um teste de fluxo lateral imunocromático para a determinação de antigénios de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*, que utiliza tanto anticorpos anti *Campylobacter* biotinilados como marcados a ouro. Numa amostra que contenha o agente patogénico, os anticorpos marcados anti *Campylobacter* formam imunocomplexos. A estreptavidina que se encontra na linha teste T liga os imunocomplexos através da biotina acoplada ao anticorpo anti *Campylobacter* formando uma coloração roxa/avermelhada na linha T. Na linha de controlo C ligam-se os anticorpos sem complexo marcados a ouro.

No caso do teste rápido de pesquisa do antigénio de *Campylobacter* ser positivo, no centro da placa de GS colocamos um filtro onde se deposita gotas de fezes, previamente diluídas com soro fisiológico caso necessário. A placa, não invertida, é incubada durante 1h a

37°C em aerobiose. Após este tempo é removido o filtro e esta placa é incubada durante 5 dias a 37°C, utilizando o GENbag, que consiste num envelope de plástico com um fecho hermético onde se coloca o gerador de atmosfera de microaerofilia e a placa do meio de cultura. Neste envelope é colocado também o meio Campyloset previamente semeado.

A Figura 3 representa duas bactérias isoladas a partir de uma amostra em zaragatoa com meio de transporte Cary-Blair.

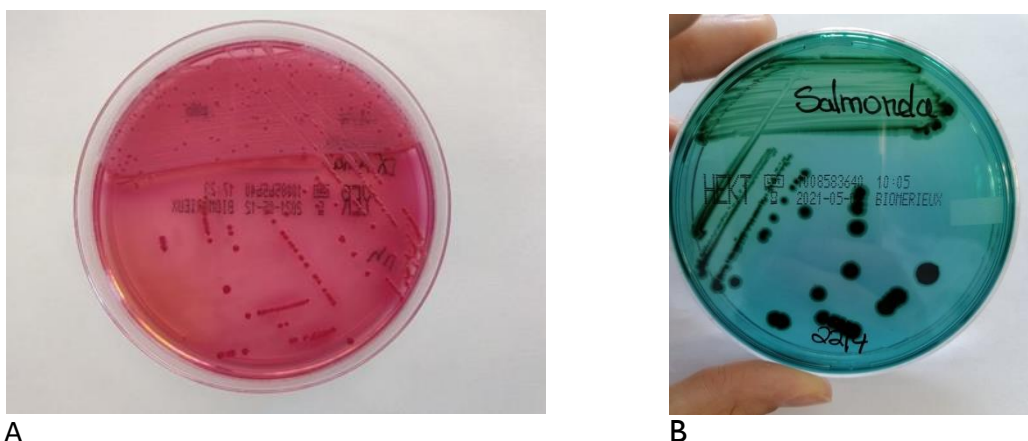


Figura 3: A - Meio Yersinia com colónias de *Yersinia*; B - Meio Hektoen com colónias de *Salmonella*. (Fonte: SPC Tomar)

- Pesquisa de sangue oculto nas fezes

Regularmente, é pedida a pesquisa de sangue oculto nas fezes. Este teste destina-se ao auxílio do diagnóstico das perturbações gastrointestinais inferiores, tal como o cancro do colon-retal que, quando detetado numa fase precoce, aumenta a probabilidade de sobrevivência. O teste Chemtrue One-Step FOB permite a deteção da hemoglobina humana em amostras fecais, sendo este um teste rápido imunocromatográfico de deteção qualitativa. Este dispositivo contém uma tira de membrana, na região da linha teste (T), revestido com anticorpo anti-hemoglobina humana e na região da linha controlo (C) contém um anticorpo de cabra anti-rato, sendo que a presença de uma banda colorida na região teste (T) indica um resultado positivo.

3.3.4 Líquidos serosos

Nos líquidos serosos estão incluídos o líquido pleural, peritoneal (ascítico), sinovial e pericárdico. Estes líquidos normalmente são estéreis por isso qualquer microrganismo presente deve ser valorizado. Estes produtos biológicos são todos processados de forma idêntica, e por serem produtos estéreis têm de ser centrifugados a 1500 rotações por minuto

(rpm) durante 20 minutos, de modo a todos os microrganismos presentes ficarem concentrados.^[5]

Após a centrifugação é decantado todo o sobrenadante. Os meios de GS, PVX e BHI são semeados com o sedimento, nunca esquecendo o esfregaço onde posteriormente é feita uma coloração. Quando na requisição médica é pedida a pesquisa de fungos, esta amostra ainda tem de ser semeada no meio de Sabouraud.

3.3.5 Secreções respiratórias

Existem diversas secreções respiratórias, tais como, a expetoração, aspirado brônquico, secreções brônquicas.

A amostra mais comum no laboratório é a expetoração, devendo esta ser colhida na primeira expetoração da manhã através de uma tosse profunda. Amostras de/com saliva devem ser rejeitadas.

Estas amostras são semeadas nos meios de GS, HAE e é efetuado um esfregaço (por esmagamento) para corar pelo método de Gram. Caso seja pedida a pesquisa de fungos, além destes meios, temos de incluir o meio de Sabouraud.

3.3.6 Exsudados/coleções purulentas

Os exsudados/coleções purulentas são produtos de diferentes origens e por isso são processados de maneiras distintas, sendo maioritariamente colhidos por zaragatoas e transportados em meio de Amies.

Se se tratar de um exsudado purulento, este é semeado em meio de MAC, GS e BHI e para a coloração de Gram são necessárias 2 lâminas e através de uma ansa é espalhado um pouco do produto microbiológico na lâmina.

Quando se trata de um exsudado ocular, auricular ou um aspirado dos seios nasais, estes são semeados em GS, HAE e BHI e é realizada a coloração de Gram. A infeção ocular mais comum é a conjuntivite provocada no adulto maioritariamente por *Staphylococcus aureus* e no recém-nascido por *Chlamydia trachomatis* que lhe é transmitida pelo canal de vaginal na altura do parto. Nas crianças com mais de três meses de idade, o *Haemophilus influenza* é um dos agentes etiológicos que mais provoca otites, já o *Haemophilus influenza*, biogrupo aegyptos, é causador de conjuntivites.

O exsudado faríngeo é apenas semeado no meio de GS e no caldo de enriquecimento BHI, realizando-se sempre a coloração de Gram. Quando se trata de uma faringite bacteriana

normalmente o agente causador é *Streptococcus pyogenes* e através do meio GS é possível detetar a β -hemólise, característico deste agente patogénico.

No caso de um exsudado nasal ou perineal, este é semeado no meio MRSA através de uma sementeira em toalha e não é efetuada uma coloração de Gram. O objetivo é essencialmente a deteção de portadores de *Staphylococcus aureus* metilina resistente, sendo o meio utilizado cromogénico, ficando com um tom rosado na presença de colónias.

Na presença de um exsudado vaginal/retal é realizado um processo semelhante ao anterior, neste caso, usamos o meio STRB. Quando uma amostra é positiva é necessário uma especial atenção pois poderá trazer complicações no momento do parto quando o bebé passa pelo canal vaginal, onde a bactéria *Streptococcus agalactiae* pode-lhe ser transmitida.

Os exsudados vaginais são semeados em GS, VCAT e CAN, é feita uma preparação a fresco para a pesquisa de *Trichomonas vaginalis* ao microscópio com o objetivo de observar o movimento do trofozoíto e ainda uma coloração de Gram.

3.3.7 Ponta de cateter

A ponta de cateter é semeada pelo método de Maki em GS.

3.3.8 Medula óssea e Líquido Cefaloraquídeo

As infeções do sistema nervoso central são raras mas quando acontecem a taxa de mortalidade associada é elevada e mesmo quando são tratadas deixam sequelas graves. A meningite caracteriza-se por uma inflamação das meninges sendo *Neisseria meningitidis* o agente patogénico mais comum nas crianças e *Streptococcus pneumoniae* o mais comum em adultos.

No laboratório quando são recebidas as amostras de medula óssea ou LCR (Líquido Cefaloraquídeo) estas devem ser processadas com a maior brevidade possível, uma vez que se trata de uma colheita invasiva e por vezes com pouco produto microbiológico. No caso de o volume ser superior a 1mL este é centrifugado durante 20 minutos a 1500rpm, posteriormente é decantado e guardado o sobrenadante para um tubo de Falcon e apenas é utilizado o sedimento que é semeado por inundação nos respetivos meios.^[5] Na maioria dos casos o volume de amostra é inferior a 1mL. Os meios são semeados por inundação. Os meios a serem utilizados para este produto microbiológico são GS e PVX. Os produtos são inoculados num caldo de enriquecimento, que favorece o crescimento bacteriano. Em ambos os produtos é realizada uma coloração de Gram.

3.4 Teste de sensibilidade à optoquina

O teste de sensibilidade à optoquina permite diferenciar *Streptococcus pneumoniae*, sensíveis à ação da optoquina, de outros *Streptococcus* alfa-hemolíticos, resistentes à ação da optoquina. A optoquina é uma substância que se difunde facilmente num meio de cultura sólido e inibe o crescimento de *Streptococcus pneumoniae*, provocando, assim, um halo de inibição da cultura em placa, enquanto em outros *Streptococcus* alfa-hemolíticos não se observa um halo de inibição.

Num tubo é colocado cerca de 1 mL de soro fisiológico e prepara-se uma suspensão da colónia a testar com uma densidade ótica de cerca de 0,5 na escala de McFarland. Esta suspensão é semeada no meio de GS, pela técnica de sementeira em toalha.

Com o auxílio de uma pinça previamente esterilizada no bico de Bunsen coloca-se o disco de optoquina no centro do inóculo. Incubar por um período de 18 a 24 horas numa estufa a 35°C com 5% CO₂.

Proceder à leitura do halo de inibição do crescimento bacteriano com uma régua; um halo inferior a 14mm indica que a bactéria é resistente à ação da optoquina, ou seja, não se trata de *Streptococcus pneumoniae*, caso o halo seja superior a 14mm, a estirpe bacteriana é sensível à ação da optoquina podendo presumir-se que se trata de *Streptococcus pneumoniae*.^[6]

3.5 Teste de suscetibilidade antimicrobiana manual

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana são realizados maioritariamente no VITEK através de cartas de identificação onde ocorrem as provas bioquímicas convencionais.

Este processo é realizado manualmente quando nos resultados obtidos pelo VITEK aparecem determinadas resistências ou quando não existem breakpoints para o microrganismo. O método utilizado é o de Kirby-Bauer (difusão em disco), que consiste na preparação de uma suspensão de uma cultura pura com uma turvação igual a 0,5 da escala de McFarland. Através de uma zaragatoa é inoculada a superfície do meio Mueller-Hinton pela técnica de sementeira em toalha. Os discos de papel de filtro impregnados com o antibiótico são colocados de forma a ficarem distribuídos pela superfície do meio permitindo a formação de halos inibitórios. Como demonstrado na Figura 4. Os halos, posteriormente, são medidos e através das regras de EUCAST o microrganismo pode ser classificado como sensível ou resistente a determinado agente antimicrobiano.^[7]

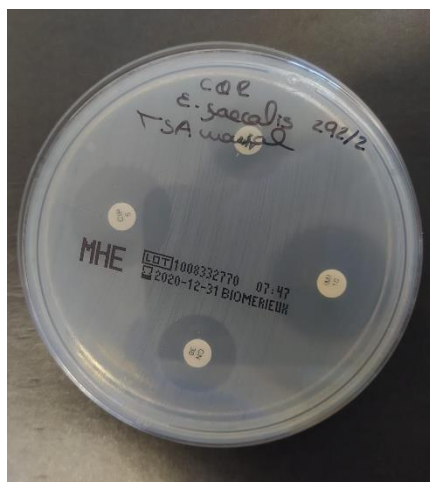


Figura 4: Teste de suscetibilidade antimicrobiana manual em meio de Mueller-Hinton.
(Fonte: SPC Tomar)

3.6 Teste rápido para a detecção de carbapenemases

Os β -lactâmicos são antibióticos de primeira linha para o tratamento de infeções causadas pelas enterobactérias. No entanto, a sua eficácia tem diminuído devido à produção de enzimas (β -lactamases) que inativam os β -lactâmicos, entre elas estão as carbapenemases. A presença de carbapenemases é detetada principalmente em meio hospitalar e são responsáveis pelas infeções nosocomiais, levando a graves problemas de saúde.

NG-Test CARBA 5 é um ensaio imunocromatográfico rápido que pode detetar os cinco tipos mais comuns de enzimas carbapenemases (KPC, OXA-48, IMP, VIM, NDM) em isolados bacterianos.

O tampão de extração líquido é usado como uma solução de lise celular quando misturado com colónias bacterianas. Cada uma das carbapenemases é reconhecida por anticorpos monoclonais que são imobilizados numa membrana de nitrocelulose. Adiciona-se o tampão envolvido com as colónias; quando só aparece a linha do teste controlo significa que a amostra não contém nenhuma das carbapenemases. Caso apresente uma linha num outro local, dependendo do sítio tratar-se-á de uma carbapenemase distinta.^[8]

3.7 Teste de suscetibilidade à colistina

A suscetibilidade à colistina é determinada por microdiluição em caldo. Este teste consiste na rehidratação da colistina pela adição de uma suspensão bacteriana com uma densidade de 0,5 MacFarland. Adicionando-se um determinado volume para um tubo com o meio Mueller-Hinton, invertemos para homogeneizar. De seguida, esta é colocada em cada poço que contém quantidades crescentes de antibiótico e só no dia seguinte é observado se

a bactéria em causa é resistente ou sensível ao antibiótico pela turvação apresentada. Como demonstrado na Figura 5.

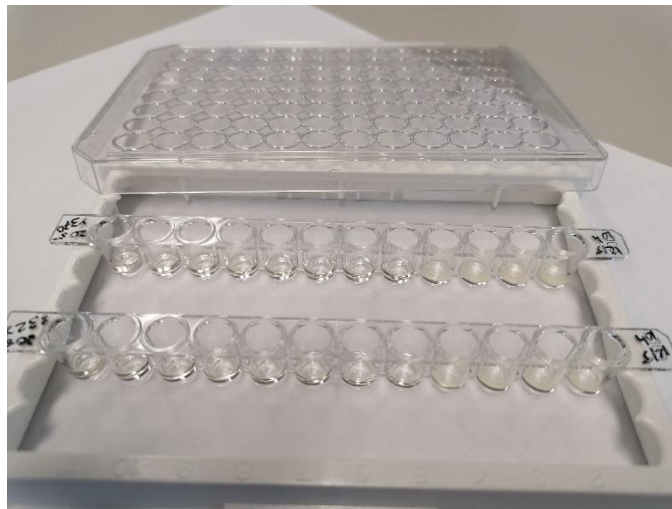


Figura 5: Teste de suscetibilidade da bactéria ao antibiótico (colistina) – Sensível.
(Fonte: SPC Tomar)

3.8 Parasitologia

Os parasitas intestinais incluem um amplo grupo de microrganismos, dos quais os protozoários e os helmintas são os mais representativos. A via fecal-oral é a principal forma de transmissão, a partir de água ou alimentos contaminados e a sua prevalência varia consoante a zona geográfica.^[9]

O exame parasitológico das fezes é constituído pela pesquisa de antígeno de *Giardia lamblia*/*Cryptosporidium parvum*/*Entamoeba histolytica* e pelo kit de concentração de ovos/parasitas fecais. Normalmente para estes pedidos são processadas três amostras, que devem ser colhidas num espaço de tempo de 7 a 10 dias. Por vezes também é solicitado pelo médico a pesquisa de ovos de *Enterobius vermicularis*.

3.8.1 Pesquisa de antígeno de *Giardia lamblia*/*Cryptosporidium parvum*/*Entamoeba histolytica*

O RIDA QUICK é um teste rápido imunocromatográfico para a deteção qualitativa de *Cryptosporidium parvum* e/ou *Giardia lamblia* e/ou *Entamoeba histolytica* em amostras de fezes. Num tubo de hemólise é adicionado tampão a uma determinada quantidade de fezes. De seguida, este tubo é colocado no vortex para uma correta homogeneização e posterior sedimentação. Na cassette são colocadas 4 gotas de amostra, esta migra arrastando os anticorpos conjugados com partículas de latex coloridas que são específicos para o antígeno do parasita alvo. Cada um dos parasitas tem uma respetiva coloração da tira de teste, o que

permite distinguir o parasita presente. A intensidade das respetivas colorações é variável, dependendo da quantidade de antigénio na amostra.^[9]

3.8.2 Kit de concentração de ovos/parasitas fecais

Este método destina-se ao processamento de amostras fecais por concentração de ovos/parasitas fecais para exame microscópico.

As técnicas de concentração estão divididas em dois passos principais, a flutuação e sedimentação. A técnica da flutuação usa densidades específicas superiores às dos ovos e quistos, separando-os dos resíduos fecais permitindo assim que os ovos e quistos se concentrem na superfície do tubo e os resíduos fecais no fundo. A técnica de sedimentação usa a técnica reversível assim os ovos e quistos concentram-se no fundo e os resíduos fecais no topo permitindo a sua remoção, permitindo, por isso, serem mais facilmente observados ao microscópio.

A nível laboratorial, a amostra é recolhida usando o coletor de amostra presente na tampa do tubo com formalina. De modo a obter uma correta homogeneização, o tubo deve ser agitado no vortex. Adiciona-se tampão B (acetato de etilo), de seguida é necessário conectar e enroscar o tubo com fundo cónico ao tubo que contém a suspensão de fezes. Inverter o sistema de tubos e retirar a parte superior. Depois é centrifugado e descartado o sobrenadante. Guardar a amostra no frigorífico para posteriormente ser visualizada ao microscópio pelo MPC/TSS.

3.8.3 Pesquisa de ovos de *Enterobius vermicularis*

O parasita *Enterobius vermicularis* (oxiúros) afeta sobretudo crianças em idade escolar e raramente os ovos e vermes são encontrados nas fezes por isso não é aconselhado para diagnóstico de infeção o exame parasitológico de fezes.

O diagnóstico laboratorial é feito com a ajuda de uma espátula de madeira para aplicar a parte adesiva de um pedaço de fita cola transparente na região perianal. Esta colheita deve ser feita de manhã, antes do banho ou defecção, para colher os ovos depositados durante a noite. A fita cola é posteriormente colocada na lâmina de vidro e observa-se ao microscópio.^[9]

3.9 **Micobacteriologia**

As colorações por Ziehl Neelsen Modificada e por Auramina permitem distinguir micobactérias de outros microrganismos. Pelo método da Auramina as micobactérias ficam

coradas de amarelo-esverdeado e pelo método Ziehl Neelsen Modificada ficam corados de vermelho num fundo azul.

Diariamente chegam amostras de produtos respiratórios que vêm com pedido de Bacilo de Koch (BK), apesar de a pesquisa não ser exclusivamente de *Mycobacterium tuberculosis*. Estas amostras são tratadas numa sala isolada onde se encontra uma câmara de fluxo laminar de nível II e o Bactec MGIT 90 onde se colocam as amostras a incubar.

As amostras suspeitas de conterem micobactérias sofrem inicialmente um processo de digestão e descontaminação, uma vez que, normalmente estão contaminadas por uma microbiota normal de crescimento rápido. É recomendado o uso de uma solução de N-acetilcisteína-hidróxido de sódio (NALC-NaOH) e este reagente é diluído com volume igual da amostra proporcionando uma liquefação e descontaminação eficaz. O reagente BBL Mycoprep contém o componente NALC numa ampola de vidro selada dentro da solução de citrato de NaOH, a ampola é partida e os reagentes misturam-se suavemente antes de serem utilizados.

As embalagens de tampão de fosfato em pó, com pH 6,8, são incluídas no *kit* para serem utilizadas na lavagem da amostra digerida e descontaminada. O tampão de fosfato diminui a atividade da solução NALC-NaOH. As amostras são centrifugadas a 3750rpm por 20 minutos com o objetivo de concentrar a amostra. A partir do sedimento são preparadas as lâminas para posteriormente serem coradas. Por conveniência, a coloração Auramina é utilizada para produtos como os aspirados e expetorações, para os líquidos serosos e LCR é usada a coloração Ziehl Neelsen modificada. Amostras estéreis como o LCR são apenas centrifugadas, de modo a concentrar a amostra, exceto quanto temos uma quantidade de amostra muito reduzida, nesse caso não se centrifuga e inocula-se todo o produto.

Depois de centrifugada a amostra, é rejeitado todo o sobrenadante e adiciona-se água tamponada, de modo a ressuspender o sedimento e coloca-se a amostra no tubo de cultura onde foi colocado previamente Panta (mistura de antibióticos com suplemento) que fornece substâncias essenciais ao crescimento rápido de micobactérias.

No Bactec MGIT são incubados os tubos de forma continua a 37°C e monitorizados a cada 60 minutos relativamente ao aumento de fluorescência. Os tubos negativos durante um período de 42 dias e que não apresentem sinais visíveis de positividade são retirados e esterilizados antes de serem eliminados. Nos tubos positivos é feito um esfregaço que é fixado com metanol e corado pela coloração de Ziehl Neelsen modificada, o que permite distinguir os bacilos ácido álcool resistentes (coram de vermelho).^[10]

3.9.1 Teste rápido de identificação de *Mycobacterium tuberculosis*

A tuberculose é uma doença altamente infecciosa causada pela bactéria MTB e é potencialmente fatal para humanos. Por esse motivo quando uma amostra é positiva para a presença de micobactérias é importante realizar um teste rápido para demonstrar a positividade para MTB, pois pode-se tratar da presença de outras espécies de micobactérias ou uma possível contaminação.

A caracterização biológica molecular, bioquímica e imunológica levou à identificação de vários antígenos em MTB, sendo uma das proteínas predominantes a MPT64, que foi encontrada num líquido de cultura composto apenas por estirpes do complexo MTB.

Este é um teste de identificação imunocromatográfica rápido para o complexo MTB e utiliza anticorpos monoclonais de rato anti-MPT64. Esta cassette de teste é composta por uma compressa de amostra, uma compressa de conjugado de ouro, uma membrana de nitrocelulose e uma compressa absorvente. Os anticorpos monoclonais de rato anti-MPT64, conjugados com partículas de ouro coloidal, são utilizadas para a captura e detecção de antígeno num ensaio tipo sandwich. Dependendo da concentração de antígeno MPT64, a intensidade da linha de teste pode variar.^[11]

3.9.2 Teste da sensibilidade antimicobacteriana de *Mycobacterium tuberculosis*

O BD Bactec MGIT 960 sire kit é utilizado como um procedimento qualitativo rápido para o teste da sensibilidade de MTB, em cultura, à estreptomicina, isoniazida, rifampicina e etambutol, permitindo, deste modo, um tratamento adequado aos doentes com tuberculose.^[12]

Recentemente, no laboratório de Microbiologia do CHMT começou a ser realizado este teste, sendo que até aqui todos os tubos positivos para MTB eram enviados para o INSA e era lá que era realizado o teste de sensibilidade antimicobacteriana. Neste momento, os resultados obtidos pelo laboratório são comparados com os do INSA, de modo, a que tenhamos a certeza que estamos a trabalhar com qualidade.

3.10 Validação

No setor de Microbiologia todos os resultados obtidos são validados pelos TSS/MPC. Os resultados são visualizados quer macroscopicamente através do meios semeados e incubados, quer microscopicamente através da observação da coloração de Gram. Caso não seja observado crescimento nos respetivos meios e na coloração de Gram apenas esteja presente a microbiota associada ao produto, a amostra é dada como negativa. Quando a

história clínica não está de acordo com o observado podemos colocar as placas a reincubar. Na ausência de crescimento após 48h de incubação o resultado é dado como negativo.

Quando na placa é observado crescimento é crucial entender o modo como este produto foi colhido e qual a sua origem. No caso de crescerem três ou mais colônias distintas no meio, a amostra respectiva é dada como contaminada e sugere-se uma nova colheita, uma vez que, neste caso seria complicado isolar cada uma das colônias num novo meio.

No caso de a amostra ser uma urina, esta é sempre considerada positiva quando a placa apresenta mais do que 100 colônias (10^5 significado UFC/mL), e quando o meio tem menos colônias devemos verificar o número de leucócitos presentes na urina, se este for superior a 500 poderemos dar como positiva. Quando as amostras são colhidas por punção supra-púbica deve ser considerado qualquer microrganismo presente, uma vez que são urinas estéreis.

No caso da expetoração, quando observamos mais de 20 células epiteliais num campo da coloração de Gram esta é rejeitada, não é considerada uma amostra de boa qualidade. Na observação dos meios se suspeitarmos de um microrganismo patogénico este pode ser identificado pelo equipamento presente no laboratório e posteriormente é realizado o antibiograma.

Para o LCR e a medula óssea, que são produtos considerados estéreis, a sua validação é dirigida de uma maneira diferente, uma vez que qualquer microrganismo presente é considerado patogénico. Na coloração de Gram quando observamos ao microscópio diplococos de Gram-negativo é possível que o agente causador da infeção seja *Neisseria spp.*, no caso de observarmos cocos de Gram-positivo em cadeia é possível tratar-se de uma infeção por *Streptococcus spp.* Assim, a partir de uma coloração de Gram, é possível, através de uma identificação presuntiva, informar o clínico do microrganismo presente, sendo realizada posteriormente a sua identificação.

Quando o produto em análise é o sangue, temos de ter sempre em consideração se não se trata de uma contaminação da pele por *Staphylococcus epidermidis*, sendo esta uma bactéria presente na pele e que, por vezes, devido à má desinfeção na altura da colheita, poderá contaminar a amostra. Para considerar que um microrganismo está a causar infeção, pelo menos três colorações de Gram devem ser coincidentes, assim como os respetivos meios. Na pediatria, como apenas é colhida uma amostra esta deve ser sempre valorizada e prosseguir para a identificação do microrganismo.

No cateter, a cultura só é considerada positiva quando crescem pelo menos 15 colônias e este tem de ser acompanhado pela hemocultura correspondente, caso contrário esta amostra é considerada contaminada.

3.11 Controlo de Qualidade

O controlo de qualidade garante que trabalhamos com qualidade em todas as etapas desde a fase pré-analítica até à fase pós-analítica. No setor de Microbiologia é realizado um Controlo de Qualidade Interno (CQI) através da utilização de estirpes bacterianas ATCC e Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) através da participação em programas, o que permite uma comparabilidade entre laboratórios.

3.11.1 Controlo de Qualidade Interno

No controlo de Qualidade Interno, no setor de Microbiologia, usamos estirpes bacterianas ATCC de características fenotípicas previamente conhecidas, permitindo avaliar os procedimentos utilizados para a realização dos testes de identificação e suscetibilidade aos antibióticos em equipamentos automáticos.

No início de cada semana é utilizada uma estirpe diferente.

Uma correta manipulação das estirpes bacterianas garante que os testes efetuados têm resultados fidedignos; para minimizar a possibilidade de alterações da estirpe ou contaminação, não se aconselha a mais do que cinco passagens.

A partir de uma cultura da estirpe ATCC são retiradas colónias para os tubos de criopreservação e armazenado à temperatura de -80°C. Para fins de CQI é descongelado um tubo de criopreservação e semeado no respetivo meio.^[6,7]

3.11.2 Avaliação externa da Qualidade

O setor de Microbiologia está envolvido em vários programas de avaliação externa de qualidade, entre eles o UK NEQAS e PNAEQ-INSA. O UK NEQAS consiste num controlo culturas e antibiogramas, onde mensalmente são enviadas três amostras liofilizadas acompanhadas do histórico do doente, que tratamos como se de uma amostra de um doente de tratasse, ou seja, são semeadas nos respetivos meios, incubadas e posteriormente é realizada a sua identificação e antibiograma. Os resultados obtidos são enviados para o programa de avaliação externa da qualidade (AEQ) correspondente.^[6,7]

Após algumas semanas, recebemos os resultados corretos que foram obtidos por laboratórios peritos; o resultado que obtivemos é comparado com os resultados de laboratórios participantes, caso o nosso resultado não seja o correto são aplicadas as devidas correções.

3.12 Casos Clínicos

Caso Clínico 1

Homem com 19 anos recorreu Serviço de Urgência (SU) por febre, vômitos e dor abdominal. Ao exame objetivo apresenta prostração, agitação psico-motora, discurso incompreensível, rigidez da nuca e sinal de Kernig positivo. Sem outros sinais e/ou sintomas.

Neste contexto foi realizada TC que sugere um possível processo inflamatório.

A punção lombar realizada foi enviada para o laboratório e foi tratada como acima descrito; esta amostra apresentava-se turva, com aparente pressão aumentada. A análise Bioquímica demonstrou um aumento de proteínas e uma diminuição da glicose.

A observação do esfregaço evidenciou a presença de diplococos de Gram negativo consistentes com *Neisseria meningitidis* dentro dos leucócitos como demonstrado na figura 6.

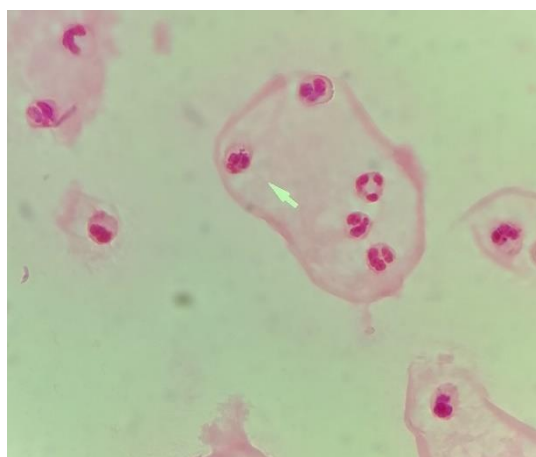


Figura 6: Observação do esfregaço. (Fonte: SPC Tomar)

No laboratório através do painel de Biologia Molecular multiplex para LCR confirmou-se a infecção bacteriana por *N. meningitidis*.

Caso Clínico 2

Criança 9 anos que deu entrada no SU por quadro diarreia grave, vômitos, febre, prostração e palidez mucocutânea.

Contexto epidemiológico de ingestão de ovos mal cozinhados, encontrando-se a mãe internada com um quadro similar. Foram colhidas 3 coproculturas para o processamento da amostra. No dia seguinte observamos o crescimento dos produtos nas placas, que apresentavam crescimento sugestivo de *Salmonella* sp., tal como demonstrado na Figura 7.



Figura 7: Meio Hektoen com colónias de *Salmonella* sp. (Fonte: SPC Tomar)

A identificação a partir do IVD Maldi Biotyper revelou a presença de *Salmonella* spp. Esta amostra foi enviada para o INSA com o intuito de identificação do sorotipo.

Caso Clínico 3

Criança 6 anos deu entrada nas urgências onde apresentava febre, dor abdominal, 5 dejeções diarreicas líquidas por dia, sem sangue ou muco. Família apresentava gastroenterite. Foi realizada uma colheita de duas coproculturas em dias consecutivos, uma vez que foi o tempo de internamento do paciente.

O RIDA QUICK é um teste de fluxo lateral imunocromático que é sempre utilizado cada vez que uma coprocultura chega ao laboratório, para despistar a possibilidade de se tratar de *Campylobacter*, devido à dificuldade do isolamento. Neste caso, o resultado revelou-se positivo.

Apesar de termos utilizado o filtro para *Campylobacter* spp. no meio de GS, e este produto ter sido semeado nos meios respetivos, como acima descrito, não foi possível isolar este microrganismo devido à microbiota associada.

A pesquisa de antígeno é específica o suficiente para comprovar este resultado.

4. Hematologia

A Hematologia é definida como o estudo das células sanguíneas e da coagulação. Inclui análises de concentração, estrutura e função das células sanguíneas e seus precursores na medula óssea.^[13]

O setor de Hematologia do SPC está bastante automatizado, no entanto, tive a oportunidade de compreender toda a componente técnica, desde a programação dos equipamentos à interpretação das cartas do controlo de qualidade, preparar e corar esfregaços de sangue periférico. Na parte da validação observei diversos esfregaços associados a diversas patologias.

4.1 Produtos

4.1.1 Sangue

O sangue é colhido num tubo próprio contendo o ácido etilenodiaminotetracético tripotássico (EDTA K3), anticoagulante quelante de iões Ca^{2+} . O EDTA é essencial para estagnar a cascata da coagulação. A técnica utilizada no laboratório para a colheita é a técnica de vácuo. A sua principal vantagem é que a tampa pode ser furada de forma a que não seja necessário removê-la para encher o tubo, e o vácuo controla a quantidade de amostra necessária garantindo, deste modo, uma razão anticoagulante/amostra adequada.

A amostra deve ser bem homogeneizada antes de ser processada; para isso podemos colocar a amostra no misturador giratório durante cerca de 2min. Quando a amostra é armazenada a uma temperatura inferior deverá ser colocada a girar até estar à temperatura ambiente.^[14]

Uma falsa trombocitopenia pode ser despistada através de uma colheita de sangue num tubo com anticoagulante citrato trissódico, prevenindo deste modo uma reação das plaquetas ao anticoagulante.

Para o teste de coagulação, o sangue é colhido para um tudo com o anticoagulante citrato de sódio, a proporção sangue/anticoagulante é muito importante, pois um volume inferior de sangue produz citrato em excesso no plasma, aumentando falsamente os tempos de coagulação.^[15]

4.1.2 Líquidos Biológicos

No laboratório são diversos os fluidos biológicos que podemos receber (LCR, pleural, peritoneal, ascítico, sinovial) onde é realizada uma contagem diferencial de todas as células.

Estes são analisados no modo manual aberto do aparelho, onde a amostra é aspirada através de uma agulha.

4.2 Colheita de amostras

Na Tabela 2 encontram-se descritos alguns fatores que podem levar a alterações do hemograma.

Tabela 2 – Fatores que influenciam o hemograma.^{14]}

Antes da colheita	Pedido incorreto; Preparação inadequada do doente; Identificação incorreta do doente; Fumar; Atividade física; Administração de medicamento dietéticos.
Durante a colheita	Amostra colocada em recipiente inadequado; Razão anticoagulante/amostra errada; Uso prolongado do garrote; Homogeneização incorreta.
Pós colheita	Incorreta identificação do tubo; Transporte inapropriado para o laboratório; Erros de processamento da amostra; Incorreta homogeneização da amostra.

Os fatores que podem estar associados a cada colheita são inúmeros, uma vez que, estes dependem de fatores fisiológicos do indivíduo, dieta, exercício físico, stress, postura, idade, sexo.^{15]}

4.3 Equipamentos

Em termos de equipamentos, este setor é constituído por dois analisadores hematológicos (Sysmex XN-1000), um aparelho que permite a determinação da velocidade de sedimentação (VS) (Test I THL), um para o doseamento da hemoglobina glicada (Arkray Adams™ A1c HA-8160), outro para a eletroforese das hemoglobinas (Hydrasis) e ainda dois aparelhos que avaliam alguns parâmetros da hemostase (ACL TOP 500 E 300).

4.3.1 Sysmex XN-1000

No SPC são utilizados analisadores hematológicos, em que a aspiração da amostra pode ser realizada quer de forma manual quer de forma automática. O aparelho tem diversas

metodologias associadas de modo a facultar um hemograma completo permitindo auxiliar o diagnóstico clínico.

Este aparelho processa as amostras, de sangue total colhido em tubos com anticoagulante EDTA K3, em modo fechado, ou seja, não é necessária remoção da tampa da amostra para esta ser processada. Este aparelho permite uma análise quantitativa e qualitativa.

A contagem dos diferentes tipos de células é realizada em canais distintos de modo a reduzir as interferências. Encontram-se descritos na Tabela 3 os diferentes parâmetros hematológicos e respetivas metodologias.

Tabela 3 – Parâmetros hematológicos e respetivas metodologias.

Parâmetros Hematológicos	Metodologia
Eritrócitos Plaquetas	Impedância com focagem hidrodinâmica
Concentração de Hemoglobina	Método de Sulfato Lauril de sódio (SLS) de hemoglobina
Leucócitos Plaquetas óticas Reticulócitos Células imaturas	Citometria de fluxo fluorescente

Metodologias

- Medição da impedância com focagem hidrodinâmica

O princípio do método foi descrito pela primeira vez por Wallace Coulter em 1956, sendo a contagem de células efetuada numa amostra de sangue diluída com uma solução eletrolítica tamponada. A taxa de fluxo da amostra que passa numa abertura entre dois elétrodos é controlada. Uma fonte constante de eletricidade é interrompida quando passa uma célula na abertura e isto provoca uma alteração do potencial elétrico levando a um aumento da tensão entre os elétrodos, que é detetada e registada. A altura dos picos produzidos indica o volume das células que passa na abertura e a amplitude indica a complexidade da célula. ^[16,17]

O objetivo da focagem hidrodinâmica é evitar que duas células passem ao mesmo tempo pelo canal e sejam contadas como uma única célula, uma vez que, poderá ocorrer a recirculação de células que já foram contadas. A aglutinação de hemácias leva a que esta seja contada como uma única célula. Estes erros podem ser corrigidos através da focagem hidrodinâmica que direciona as células para o centro da abertura da célula de fluxo. Este permite a medição do

impulso elétrico; deste modo as células passam em fila única, melhorando a precisão e reprodutibilidade do método.^[16,17]

- Citometria de fluxo

Técnica que permite a identificação e quantificação das células sanguíneas com base nas suas características (tamanho e complexidade celular) através de um canal diferencial. Este método funciona com base no princípio da dispersão da luz e fluorescência.

As células sanguíneas ao passarem no canal são atingidas por um feixe de laser semiconductor que permite a separação das células através de três sinais distintos:

- Dispersão de luz frontal (indicação sobre o tamanho da célula);
- Dispersão de luz lateral (indicação sobre a complexidade da célula);
- Fluorescência lateral (indicação sobre a quantidade de DNA e RNA presente na célula).

A luz que incide na célula é dispersada e detetada por um fotodetector num determinado ângulo, sendo transformada num impulso elétrico. As células que apresentem propriedades físicas e químicas similares são agrupadas em diferentes zonas do histograma.^[18]

A contagem de leucócitos e eritroblastos é realizada no canal WNR pelo método de citometria de fluxo de fluorescência. O reagente ácido provoca a lise celular, principalmente de eritrócitos e plaquetas, enquanto o corante de polimetina cora os ácidos nucleicos. A diferença de complexidade celular e tamanho são avaliados, respetivamente, a partir dos sinais de dispersão lateral e frontal.

As plaquetas são identificadas e quantificadas pelo corante fluorescente, oxazina, que cora as superfícies dos retículos endoplasmáticos rugosos e das mitocôndrias. Essa reação tem excelente correlação com a análise de CD41/CD61 e também minimiza as interferências na presença de fragmentos celulares. Também tem a capacidade de analisar o grau de imaturidade das plaquetas.^[18]

As células vermelhas circulantes no sangue periférico são classificadas e diferenciadas pelo seu tamanho e estado de maturação celular. Esta análise fornece uma avaliação celular completa da eritropoiese, útil na triagem dos quadros de anemia e no monitoramento das terapias com ferro quando utilizadas em conjunto com outras informações clínicas.

- Método de detecção Sulfato Lauril de Sódio de hemoglobina

Para a determinação da hemoglobina é utilizado o Sulfolyser que é um reagente límpido, isento de cianeto e de baixa toxicidade.

No método Sulfato Lauril de Sódio (SLS) de hemoglobina, um surfactante aniônico provoca a lise da membrana do eritrócito libertando a hemoglobina. A hemoglobina livre é transformada em metahemoglobina. Ocorre a ligação do grupo hidrofóbico do SLS à metahemoglobina originando um composto corado estável. A concentração de hemoglobina é quantificada por colorimetria através de um fotodetector, sendo a absorvência medida a 555nm.

O Sulfolyser tem determinadas vantagens quando comparado com outros métodos isentos de cianeto, na medida em que consegue medir derivados da hemoglobina.^[19]

4.3.2 Test I THL

A amostra de sangue total colhida para um tubo de EDTA K3 é a utilizada para a determinação da VS no equipamento Test I THL, sendo a metodologia impregnada neste aparelho a fotometria capilar de fluxo. O tubo de hemograma é colocado no aparelho onde é aspirada uma determinada quantidade de amostra para um capilar que é centrifugada a 20g. A leitura é realizada posteriormente por fotometria de infravermelhos a 950nm.

Os impulsos elétricos reconhecidos por um detetor de fotodiodos estão diretamente correlacionados com a quantidade de eritrócitos presentes no capilar. Através dos impulsos captados é ilustrada para cada amostra uma curva de sedimentação, sendo estes resultados convertidos para valores equiparáveis ao método de referência (Método de Westgreen).

4.3.3 Arkray Adams™ A1c HA-8160

O equipamento utilizado no laboratório para o doseamento da hemoglobina glicada é o Arkray Adams™ A1c HA-8160, a amostra utilizada é sangue total colhido num tubo de EDTA K3 e a metodologia que lhe está associada é a Cromatografia Líquida de Alta Pressão.

Esta metodologia apresenta algumas vantagens em relação à cromatografia gasosa, tais como temperatura de separação dos compostos mais baixa, permitindo uma melhor separação dos compostos termolábeis e muitos dos compostos orgânicos são instáveis ou pouco voláteis não podendo ser analisados por cromatografia gasosa sem antes ser realizada uma derivatização química.^[17]

A metodologia utiliza uma coluna composta por uma resina de troca catiónico de fase reversa. As diferentes hemoglobinas que se encontram carregadas positivamente são desagregadas através da adsorção na fase estacionária que está carregada negativamente, sendo eluída pela fase móvel posteriormente.

As frações da hemoglobina, HbA1c, HbA1, HbF, HbA2 e outras variantes da hemoglobina, são identificadas através de uma observação dos tempos de retenção da amostra em comparação com os resultados obtidos do controlo, e a sua deteção é realizada mediante a determinação da absorvância a 415 e 500nm.

4.3.4 Hydrasis

A eletroforese é executada a partir de uma amostra de sangue total colhido num tubo de EDTA K3 que é previamente hemolisada através da lavagem dos glóbulos vermelhos em soro fisiológico. A eletroforese das hemoglobinas é realizada num gel de agarose a pH alcalino e coradas com uma solução de negro amido. O excesso de corante é eliminado com uma solução ácida. As eletroforeses resultantes podem ser analisadas visualmente ou ser avaliadas por densitometria, permitindo uma quantificação relativa e precisa das distintas hemoglobinas, tais como a hemoglobina A₂ no diagnóstico de β – talassémia. Este método permite confirmar a identificação das variantes da hemoglobina (HbS, HbD, HbE ou HbC).^[20]

4.4. Análises efetuadas

4.4.1 Hemograma

O hemograma é um dos exames complementares de diagnóstico mais solicitados, uma vez que, fornece informações quantitativas e qualitativas dos elementos celulares auxiliando o médico tanto no rastreio, como na monitorização de determinadas patologias e no seu diagnóstico.

Contagem de eritrócitos

A contagem de eritrócitos (RBC) corresponde ao número de eritrócitos por unidade de volume de sangue e é determinada através da seguinte fórmula:

$$\text{RBC} = \text{número total} \times 10^{12} \text{ células/L ou número total} \times 10^6 \text{ células/}\mu\text{L}$$

Hematócrito

O hematócrito (HCT) corresponde ao volume ocupado pelos glóbulos vermelhos em relação ao volume total de sangue.

Um valor reduzido do hematócrito é uma situação muito comum na anemia, enquanto que um valor aumentado pode ser indicativo de policitémia.

$$\text{HCT (L/L)} = \text{MCV (fL)} \times \text{RBC (x } 10^{12}/\text{L)}$$

- Índices eritrocitários

Volume Globular Médio

O Volume Globular Médio (VGM) informa sobre o volume médio de um eritrócito, sendo importante na classificação das anemias como a microcítica (VGM<80 fL), normocítica (VGM 80-100 fL) ou macrocítica (VGM>100 fL).

$$\text{VGM (fL)} = \text{HCT (\%)} : \text{RBC (x} 10^{12}/\text{L)} \times 10$$

Hemoglobina Globular Média

A Hemoglobina Globular Média (HGM) indica o valor médio de hemoglobina por eritrócito, dividindo a concentração de hemoglobina pelo número de eritrócitos, é expresso em picogramas. Este parâmetro em conjunto com CMHG permitem distinguir as anemias de hiperocrômicas (HGM>32 pg), normocrômicas (HGM 27-32 pg) e hipocrômicas (HGM<27 pg).

$$\text{HGM (pg)} = \text{VGM (g/dL)} : \text{RBC (x} 10^{12}/\text{L)}$$

Concentração Média de Hemoglobina Globular

A Concentração Média de Hemoglobina Globular (CMHG) corresponde à concentração média de hemoglobina num determinado volume de eritrócitos, expresso em g/dL.

$$\text{CMHG(g/dL)} = \text{HGM (g/dL)} : \text{HCT (\%)} \times 100$$

Coeficiente de Dispersão Eritrocitário

O coeficiente de dispersão eritrocitária (RDW) indica o grau de anisocitose eritrocitária, ou seja, representa a percentagem de variação do volume dos eritrócitos. Este valor é obtido de forma automática através do histograma de distribuição de volume dos eritrócitos (coeficiente de variação). Este parâmetro é útil na distinção de diferentes anemias. No caso de uma anemia por deficiência de ferro o RDW encontra-se aumentado, ou seja,

existe uma população heterogénea de eritrócitos. Numa anemia da doença crónica o RDW apresenta-se normal.

4.4.2 Leucograma

O leucograma baseia-se na contagem total de leucócitos e formas leucocitárias. Através do estudo dos glóbulos brancos podem ser diagnosticadas alterações patológicas e fisiológicas.

4.4.3 Plaquetograma

O plaquetograma baseia-se na contagem total de plaquetas e permite essencialmente fazer uma avaliação quantitativa.

4.4.4 Esfregaço de sangue periférico

O esfregaço de sangue periférico é solicitado pelo TSS/MPC quando, por exemplo, suspeitam de uma falsa trombocitopenia devido à presença de agregados plaquetares.

Um esfregaço é uma leve camada de matéria orgânica sobre uma lâmina de vidro formando uma fina película, para posterior coloração e observação microscópica.^[21]

A amostra utilizada para a execução do esfregaço sanguíneo é o sangue, sendo a lâmina devidamente identificada com o número do pedido e a data, e posteriormente colocada no equipamento RAL Stainer, que efetua a coloração de May Grünwald – Giemsa. Como demonstrado na Figura 8.

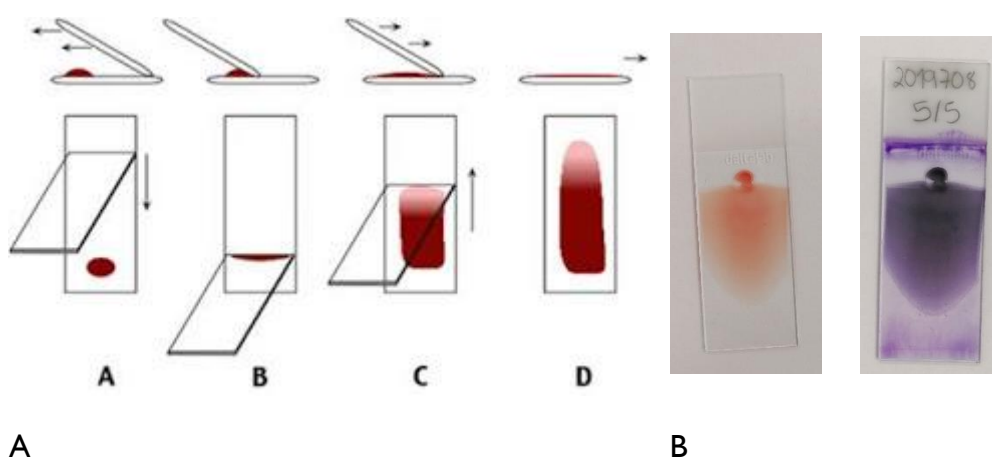


Figura 8: A - Ilustração de como executar um esfregaço de sangue periférico manual (<http://hemocitologia.blogspot.com/2010/08/esfregaco-do-sangue-periferico.html>)²² ; B - Esfregaço de sangue periférico (Fonte: SPC Tomar)

A Coloração MayGrünwald-Giemsa é efetuada com metanol, que essencialmente tem como objetivo a fixação do esfregaço, e com eosina e azul de metileno, que têm a capacidade de corar as estruturas celulares.^[23]

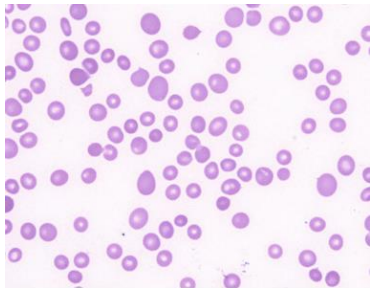
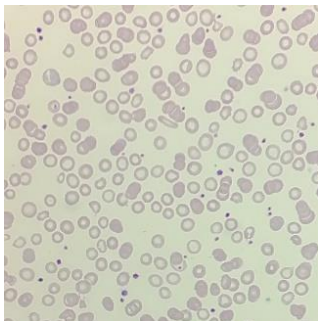
A eosina, como corante ácido, cora os componentes com propriedades basófilas (eosinófilos) de rosa-alaranjado e o azul metileno, como corante básico, cora as estruturas com propriedades acidófilas (basófilos) de azul-arroxeadado. Estruturas neutras coram de vermelho-arroxeadado.^[23]

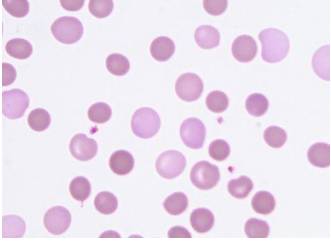
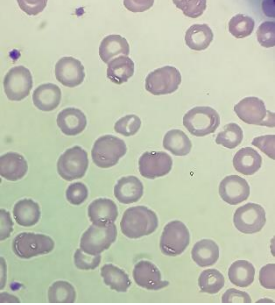
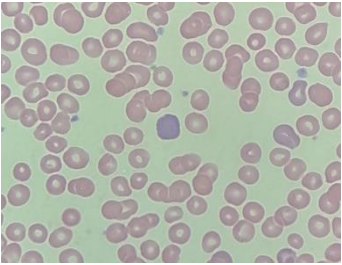

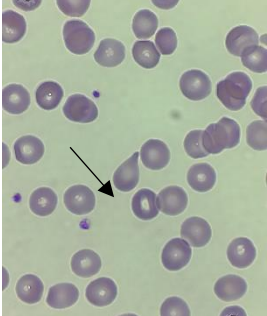
Para observação microscópica do esfregaço de sangue periférico é essencial proceder à sua observação com uma objetiva de 10x, de modo, a avaliar se as células se encontram distribuídas de igual forma ao longo do esfregaço e posteriormente com uma objetiva de 50x. Observa-se a série vermelha, branca e plaquetas, assim como a contagem de leucócitos e eritroblastos. Na objetiva de imersão de 100x é possível observar com mais pormenor o conteúdo celular.

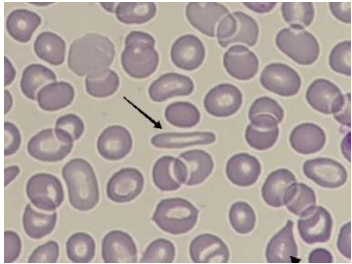
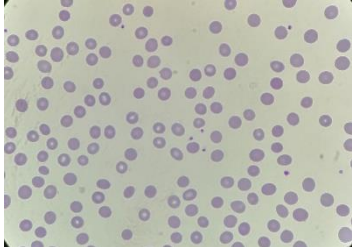
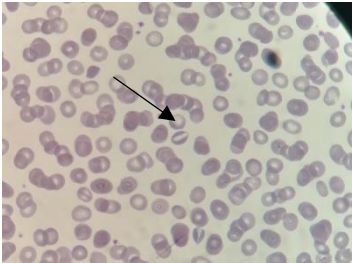
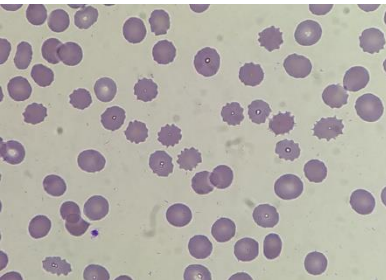
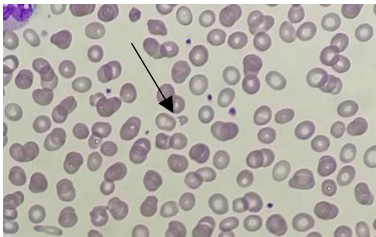
- Série Vermelha

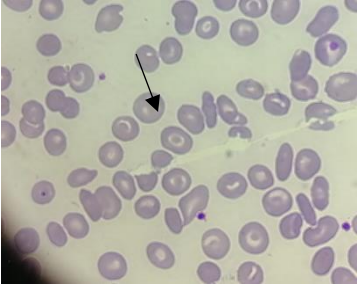
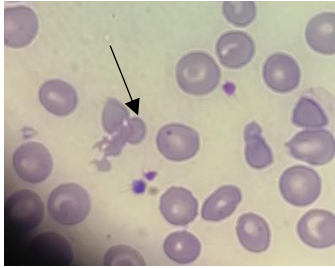
No ESP podem observar-se diversas alterações nas formas dos eritrócitos (poiquilocitose), no tamanho (anisocitose), cor (anisocromia) mas também reticulócitos e/ou eritroblastos e ainda inclusões eritrocitárias como demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4 – Alterações na série vermelha e as principais causas.^[24,13]

Imagem	Alteração	Patologia associada
	Aumento de tamanho - macrocitose	Anemia megaloblástica Deficiência Vitamina B12 ou ácido fólico Alcoolismo Doença hepática Síndrome mielodisplásica
	Diminuição de tamanho - microcitose	Anemia por deficiência em ferro Algumas talassémias/hemoglobinopatias Anemia da doença crónica

	<p>Hipercromia, cor mais acentuada, normalmente associado com CHGM entre 36 a 38 g/dL</p>	<p>Esferocitose hereditária</p>
	<p>Hipocromia, cor pouco acentuada</p>	<p>Anemia por deficiência em ferro Algumas hemoglobinopatias Anemia da doença crônica</p>
	<p>Coloração acinzentada dos eritrócitos - Policromasia</p>	<p>Anemia hemolítica Tratamento de anemia Transfusão</p>
	<p>Acantócitos</p>	<p>Hepatopatias Abetalipoproteinemia Insuficiência renal</p>
	<p>Dacriócitos</p>	<p>Mielofibrose Hematopoiese extramedular</p>

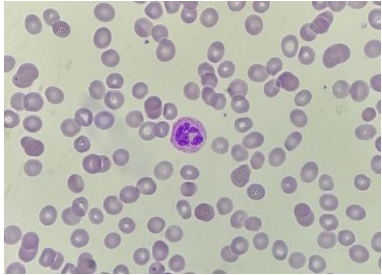
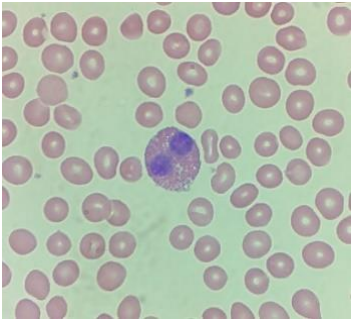
	<p>Elíptocitos</p>	<p>Elíptocitose hereditária Anemia por deficiência em ferro Anemia megaloblástica Talassemias</p>
	<p>Esferócitos</p>	<p>Esferocitose hereditária Anemia hemolítica autoimune Septicemia Reações de transfusões Incompatibilidade ABO</p>
	<p>Estomatócitos</p>	<p>Estomatocitose hereditária Alcoolismo Hepatopatias</p>
	<p>Equinócitos</p>	<p>Urémia Deficiência em piruvato cinase Anemia hemolítica microangiopática</p>
	<p>Esquizócitos</p>	<p>Coagulação intravascular disseminada (CID) Púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) Síndrome hemolítico-urémico (SHU)</p>

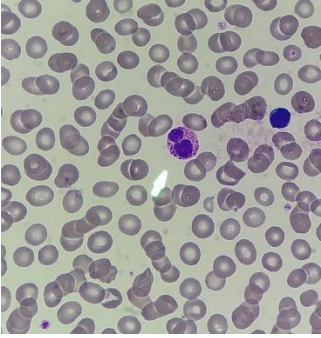
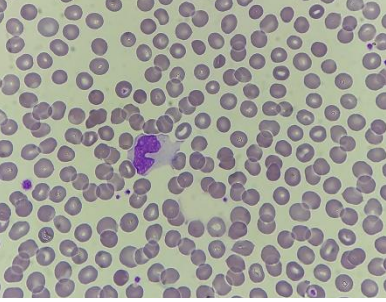
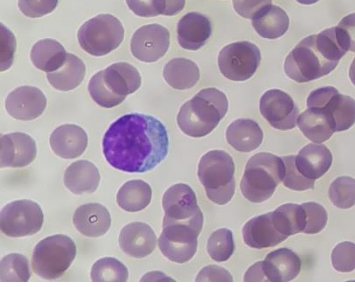
	<p>Células em alvo</p>	<p>Anemia por deficiência em ferro Hepatopatia Hemoglobinopatias</p>
Inclusões Eritrocitárias		
	<p>Corpos de Howell-Jolly</p>	<p>Esplenectomia Anemia megaloblástica Anemia hemolítica</p>

- Série Branca

Permite a observação da morfologia dos leucócitos e estado de maturação. Algumas alterações encontram-se descritas na Tabela 5.

Tabela 5 – Alterações na série branca e as principais causas.^[25, 13]

Imagem ¹	Alteração	Causas associadas
<p>Neutrófilos (45-70%)</p> 	<p>Neutrofilia (>7.0x10⁹/L)</p>	<p>Infeções Doenças inflamatórias Stress</p>
	<p>Neutropenia (<1.5x10⁹/L)</p>	<p>Anemia megaloblástica Doenças hepáticas Lúpus sistêmico</p>
<p>Eosinófilos (1.5%)</p> 	<p>Eosinofilia (>0.4x10⁹/L)</p>	<p>Alergias Infeções parasitárias Eosinofilia reativas Leucemia eosinofilia Síndrome hipereosinofilia idiopática Linfoma das células T/B Linfoma Hodgkin Leucemia linfoblástica aguda</p>

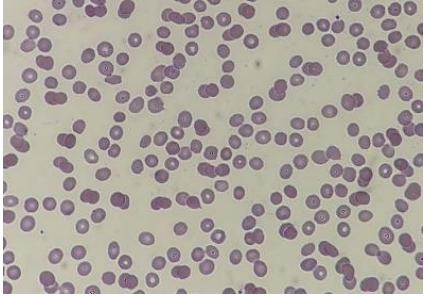
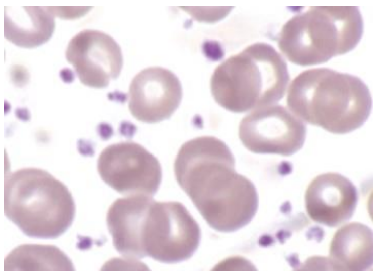
	Eosinopenia ($<0.4 \times 10^9/L$)	Administração prolongada de esteróides
Basófilos (<1%) 	Basofilia ($>0.1 \times 10^9/L$)	Síndromes mieloproliferativas Leucemia mielóide crónica
Monócito (2-10%) 	Monocitose ($>0.7 \times 10^9/L$)	Infeções crónicas Doenças inflamatórias Leucemia mielóide crónica Leucemia aguda Leucemia mielomonocítica crónica
	Monocitopenia ($<0.2 \times 10^9/L$)	Terapêutica com glucocorticoides
Linfócito 	Linfocitose ($>3.7 \times 10^9/L$)	Leucemia linfocítica crónica Infeções virais (mononucleose infecciosa) Lupus sistémico eritematoso
	Linfopenia ($<1.0 \times 10^9/L$)	Infeções virais (mononucleose infecciosa)

¹ As imagens que se encontram na Tabela 6 correspondem células leucocitárias normais.

- Plaquetas

Permite observar a morfologia das plaquetas, a sua granulação e disposição ao longo do esfregaço. Encontram-se descritas na tabela 6 algumas causas associadas a situações de trombocitopenia e trombocitose.

Tabela 6 – Alterações nas plaquetas e as principais causas.^{[25][3]}

Imagem	Causas associadas
<p>Trombocitopenia (<150x10⁹/L)</p> 	<p>Síndrome Bernard Soulier Síndrome das plaquetas cinzentas Síndrome May-Hegglin</p>
<p>Trombocitose (>450x10⁹/L)</p> 	<p>Aumento da produção Hiposplenismo Anisocitose plaquetária extrema Stress inflamatório agudo Sangramento Neoplasias mieloproliferativas</p>

4.4.5 Velocidade de sedimentação eritrocitária

A velocidade de sedimentação eritrocitária (VS) corresponde à distância, em milímetros, a que os eritrócitos sedimentam, por ação da gravidade, num intervalo de tempo (1h). A velocidade a que estes sedimentam está dependente da forma, massa, volume dos eritrócitos, assim como de fatores plasmáticos.^[26]

Esta análise é pedida com grande frequência principalmente para a monitorização de doenças inflamatórias, uma vez que, na presença deste tipo de doenças, ocorre um aumento das proteínas de fase aguda, tal como, o fibrinogénio. Estas proteínas possuem cargas positivas e ao ligarem-se aos eritrócitos neutralizam as suas forças repulsivas provocando a agregação dos eritrócitos com formação de rouleaux. Desta forma, a massa celular aumenta levando a um aumento da VS.

Esta análise apesar de sensível é muito inespecífica, devido a este parâmetro se encontrar aumentado em diversas patologias, doenças inflamatórias, infeções, neoplasias, entre outras.^[27]

No entanto, esta prova analítica encontra-se diminuída em certas patologias, nomeadamente, insuficiência cardíaca congestiva, doença falciforme, policitémia, esferocitose e anisocitose. Patologias que possam provocar alteração na forma dos eritrócitos, interferem com a formação de rouleaux, levando a uma diminuição da VS.^[27]

4.4.6 Hemoglobina glicada

A hemoglobina glicada resulta de uma reação não enzimática, lenta e irreversível entre a glicose que circula no sangue e os grupos amina livres existentes na hemoglobina dos eritrócitos.^[28]

O doseamento da hemoglobina glicada/glicosilada é um parâmetro fundamental no controlo dos doentes diabéticos, uma vez que, avalia o valor médio de glicémia nos últimos 120 dias. Este tem possíveis desvantagens, nomeadamente a possibilidade de o valor ser alterado por outros fatores que não estão associados à glicose, tais como a duração de vida dos eritrócitos, etnia e hemoglobinopatias. As vantagens que estão inerentes a este doseamento é o facto de o individuo não necessitar de estar em jejum e as amostras poderem ser colhidas a qualquer momento do dia.^[29]

4.4.7 Eletroforese das Hemoglobinas

No adulto, as variantes de hemoglobina presentes são a HbA, HbA2 e a HbF, sendo as proporções destas variáveis ao longo da vida.

As hemoglobinopatias são patologias hereditárias caracterizadas por deficiências quantitativas de uma ou mais cadeias globínicas de Hb (talassémias), alterações estruturais da cadeia globínica (variantes da Hb) ou hemoglobinas estruturalmente anómalas que produzem um fenótipo talassémico (hemoglobinopatias talassémicas).

A hemoglobina C e S são duas das diversas variantes existentes na hemoglobina.^[30]

4.5 Hemostase

A hemostase é um conjunto de mecanismos que visam manter a normal funcionalidade da circulação sanguínea e também interromper a hemorragia, quando necessário, através da formação de um coágulo.^[31]

O mecanismo hemostático é constituído por cinco componentes essenciais, os vasos sanguíneos, plaquetas, fatores plasmáticos e seus inibidores e o sistema fibrinolítico.^[32]

As plaquetas fazem parte da hemostase primária, a sua adesão ao local da lesão envolve a ligação direta das plaquetas ao colagénio subendotelial através dos seus recetores GP Ia/IIa e GPIIb/IIIa e uma ligação indireta ao colagénio subendotelial através da via fator de von Willebrand. Esta adesão inicial leva à alteração da sua forma e à secreção de grânulos (α e β). Além disso, o tromboxano A₂ que é um ativador plaquetário mais potente provoca uma ativação plaquetária completa que causa uma alteração na conformação da superfície

plaquetária originando uma forma ativa que tem a capacidade de se ligar ao fibrinogénio e, subsequentemente, causa a agregação plaquetária.^[32]

A coagulação do sangue (hemostase secundária) é um processo biológico que ocorre através da conversão de uma molécula solúvel (fibrinogénio) numa molécula insolúvel (fibrina).^[32]

A fibrinólise é um mecanismo cujo o objetivo é a degradação do coágulo de fibrina. A plasmina tem a capacidade de transformar o coágulo de fibrina em produtos solúveis que são eliminados da circulação sanguínea pelo fígado.

4.5.1 Equipamento (ACL TOP 300 E 500)

O ACL TOP é o equipamento utilizado no laboratório para auxiliar na monitorização da terapêutica oral com anticoagulantes e diagnosticar patologias associadas a distúrbios provocados por uma falha na hemostase.

Este aparelho utiliza o plasma em citrato como amostra, após centrifugação a 1500 rpm durante 10 minutos do sangue total num tubo com anticoagulante citrato trissódico.

Metodologias

- Medição coagulométrica (turbidimetria)

O princípio de deteção do coágulo por turbidimetria é usado, de modo a medir e registar a quantidade de tempo necessário até à formação do coágulo, através da densidade ótica. Um feixe de luz com 671 nm incide na suspensão sendo este dispersado e detetado pelo fotodetector que se encontra posicionado a 180°. Inicialmente a luz que chega ao fotodetector é maior visto que o coágulo ainda não se encontra formado e por isso o feixe de luz que consegue atravessar a amostra é superior, sendo que, este vai diminuindo à medida que o fibrinogénio é convertido em fibrina.^[17]

- Medição imunológica

O método imunológico baseia-se no reconhecimento de uma proteína específica por anticorpos policlonais ou monoclonais acoplados a micropartículas de látex. A amostra do doente (plasma) é incubada com os anticorpos. Este método é semelhante ao método turbidimétrico, mas ocorre a formação de um complexo antigénio-anticorpo originando um aglutinado de micropartículas de látex, onde incide um feixe de luz a 475 nm ou 671 nm, sendo a luz absorvida proporcional à concentração de complexos antigénio-anticorpo presentes na cuvete.

- Medição colorimétrica

As serina proteases (enzimas da cascata de coagulação) tem especificidade para determinado substrato (peptídeo sintético) ao qual está agregado ao aminoácido terminal um cromóforo (p-nitroanilina). Quando o peptídeo sintético reage com a enzima específica, o cromóforo é clivado e detetado por colorimetria a 405nm. A luz que alcança o fotodetector é convertida num sinal elétrico diretamente proporcional à concentração do cromóforo clivado. O método colorimétrico pode ser direto ou indireto. No ensaio direto é aquele em que o analito de interesse interage diretamente com o substrato específico. Quando o analito de interesse reage com uma enzima para formar complexos inativos, nesta situação a concentração do analito é inversamente proporcional à absorvância detetada.^[31]

4.5.2 Análises efetuadas

Determinação do Tempo de Protrombina

O tempo de protrombina (TP) visa avaliar a via extrínseca da coagulação e monitorizar a terapêutica com anticoagulante oral.

A via extrínseca da cascata de coagulação é avaliada através da medição do tempo que leva à formação do coágulo aquando a adição do reagente de tromboplastina (FT), cálcio (CaCl₂) ao plasma. Esta determinação é útil para identificar deficiências ou inibidores dos fatores VII, X, V, II e da concentração de fibrinogénio presente no plasma.^[33]

O método utilizado é o coagulométrico.

Com o objetivo de equiparar os resultados obtidos entre diferentes laboratórios devido à variação da tromboplastina utilizada nos ensaios, a OMS indicou o uso do Índice Internacional Normalizado (INR).^[33]

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{TP (UTENTE)}}{\text{TP (CONTROLO)}} \right)^{\text{ISI}}$$

Determinação do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

O tempo de tromboplastina parcial ativa (TTPA) monitoriza os doentes que estão sob terapêutica com heparina e avalia a via intrínseca da coagulação.

A determinação do TTPA é realizada através da medição do tempo de coagulação do plasma após a ativação dos fatores de contato, adição de fosfolípidos e cloreto de cálcio (CaCl₂), mas sem adição de tromboplastina tecidual e, portanto, indica a eficiência geral da via intrínseca e comum.

Este valor encontra-se aumentado em situações de défice de fator (XII, XI, X, IX, VIII, V, II ou fibrinogénio), doenças hepáticas, presença heparina, défice de vitamina K.

O método utilizado é o coagulométrico.^[31]

Determinação do Tempo de Trombina

O tempo de trombina (TT) visa a medição do tempo que leva à formação do coágulo aquando a adição da trombina ao plasma, sendo este resultado afetado pela concentração e função do fibrinogénio e pela presença de substâncias inibidoras.^[31]

O método utilizado é o coagulométrico.

Determinação do Fibrinogénio

O fibrinogénio é uma glicoproteína sintetizada a nível hepático.

O método utilizado é o coagulométrico (método de Clauss).

O fibrinogénio é quantificado pelo método de Clauss, que consiste numa diluição inicial do plasma onde irá ser adicionado uma solução saturada em trombina, de modo a que a formação de fibrina dependa exclusivamente da concentração de fibrinogénio plasmático, evitando alterações do tempo de coagulação do plasma.^[32]

Determinação da Proteína C ativada (PCa)

A proteína C é dependente de vitamina K, e é ativada na presença de trombomodulina (proteína da célula endotelial) e trombina. O défice de PC está relacionado com patologias hepáticas, défices de vitamina K e a um acréscimo do risco de tromboembolismo venoso.^[32]

O método utilizado é a colorimetria direta.

Determinação da Proteína S

A proteína S é dependente de vitamina K, atua como co-fator da PCa, amplificando a sua ação anticoagulante e profibrinolítica. A proteína S (PS) plasmática encontra-se em equilíbrio entre a forma livre que funciona como co-fator e a forma ligada à proteína transportadora da fração C4b do complemento.^[33]

Através do método Imunoturbidimétrico a PS livre é determinada através do aumento da turbidimetria resultante da aglutinação de dois reagentes de látex. A C4BP purificada adsorvida no primeiro reagente de látex reage com elevada afinidade para a PS livre no plasma do doente na presença de iões Ca^{2+} . O complexo formado ao entrar em contato com um segundo reagente que contém partículas de látex revestidas de anticorpos monoclonais

específicos da PS origina um aglutinado. O grau de aglutinação é diretamente proporcional à concentração de PS livre presente no plasma.

Determinação dos D-Dímeros

Os D-Dímeros são o produto resultante da degradação do coágulo de fibrina pela plasmina. A sua determinação visa auxiliar o diagnóstico de coagulação intravascular disseminada (CID), trombose venosa profunda (TVP) e tromboembolismo pulmonar (TPE), sendo que nestas patologias o valor se encontra aumentado.^[32]

O método para a determinação deste parâmetro é o imunoturbidimétrico que utiliza partículas de látex revestidas com anticorpo monoclonal específico do domínio D-dímero.

Determinação da antitrombina

A antitrombina tem um efeito anticoagulante que é potencializado pela heparina endógena e exógena. O déficit de antitrombina tanto pode estar associado a um defeito molecular (herdado) como pode ser adquirido, devido por exemplo, a doença hepática.^[32] O método utilizado para a determinação deste parâmetro é a colorimetria indireta.

Fator von Willebrand

O significado (FVW) é uma glicoproteína importante na adesão e coagulação de plaquetas, sintetizado nas células endoteliais e megacariócitos.

O método Imunoturbidimétrico é utilizado para a determinação quantitativa do antígeno FVW em plasma humano é realizada por turbidimetria de partículas de látex.^[32]

4.6 Validação

No SPC a validação dos parâmetros analisados é efetuada pelo TSS/MPC, com base na história clínica do doente e nos resultados obtidos em análises anteriores.

No caso do hemograma após todos os parâmetros serem analisados, pode ser necessário a observação do ESP caso haja alteração dos valores sem ser conhecida a patologia associada ao doente. Por vezes, também existe a necessidade da verificação da existência de coágulo na amostra, quando, por exemplo, existe a suspeita de uma falsa trombocitopenia.

Na validação da hemostase, caso o pedido provenha da consulta de hipocoagulação este é apenas para ajustar a dose do anticoagulante, caso seja necessário. Se for um utente do exterior o resultado é validado com base nos resultados anteriores, valores muito discrepantes podem levar à repetição da análise.

Assim, os restantes parâmetros são avaliados com base no histórico do doente, caso ocorra alguma alteração brusca, estas análises podem ter que ser repetidas.

4.7 Controlo de Qualidade

O controlo de Qualidade consta da execução de processos analíticos que visam assegurar a qualidade dos resultados obtidos e a sua fiabilidade, através de determinados procedimentos que abrangem desde a fase pré-analítica até à fase pós-analítica de modo a detetar possíveis falhas.

4.7.1 Controlo de Qualidade interno

O controlo interno tem como objetivo monitorizar a precisão dos processos analíticos, detetar erros relativos aos equipamentos, reagentes, bem como erros relativos à operacionalidade.^[34]

No setor de Hematologia, a periodicidade com que cada controlo é feito está estabelecida, no entanto, existem exceções, tais como, após uma calibração ou recalibração, ou quando ao longo de um período de tempo os resultados demonstram uma tendência.

Os controlos encontram-se maioritariamente armazenados no congelador e para cada analito são utilizados 2 ou 3 níveis de controlo, que cubram preferencialmente gamas de valor normal e patológico, sendo estes inseridos no instrumento de trabalho tal como uma amostra, através de um código de barras.^[34] Os resultados são posteriormente transmitidos para o sistema informático e registados em cartas de Levey-Jennings que são verificadas diariamente de acordo com as Regras de Westgard.^[35]

Após a examinação das cartas, se algum resultado de controlo de qualidade demonstrar uma tendência ou alguma regra for violada poderá ser necessário uma recalibração ou inserir um novo reagente e só depois de todos os resultados estarem conformes podemos processar as amostras dos utentes.

4.7.2 Avaliação externa da Qualidade

A AEQ consiste na avaliação por uma entidade externa dos resultados obtidos pelo laboratório, permitindo uma evolução laboratorial e uma comparação com os resultados obtidos por outros laboratórios demonstrando a uniformidade no trabalho.

O SPC participa em vários programas de AEQ fornecidos por entidades credenciadas.

Todos os ensaios vêm acompanhados com documentação que informa como manusear, hidratar, processar e armazenar as diferentes amostras assim como a calendarização da entrega dos resultados.

Quando os resultados obtidos pelo não laboratório não vão de encontro aos resultados esperados, são estabelecidas ações corretivas, de modo, a melhorar o desempenho laboratorial.^[36]

4.8 Casos Clínicos

Caso Clínico I

Mulher com 23 anos foi ao SU devido a um cansaço fácil com 2 meses de evolução, que se agravou na última semana. Apresentava uma palidez cutâneo-mucosa, com queilite angular mas sem alterações ungueais. Resultados das análises laboratoriais demonstrados na Tabela 7.

Tabela 7 – Resultados das análises laboratoriais.

Parâmetros	Resultados	Unidades	Gama de referência
Leucócitos	7,21	10 ⁹ /L	4,0 – 10,0
Neutrófilos	4,16	10 ⁹ /L	1,5 – 7,0
Linfócitos	2,29	10 ⁹ /L	1,0 – 3,7
Monócitos	0,36	10 ⁹ /L	0,0 – 0,7
Eosinófilos	0,35	10 ⁹ /L	0,0 – 0,4
Basófilos	0,04	10 ⁹ /L	
Eritrócitos	2,64	10 ¹² /L	
Hemoglobina	<u>4,1</u>	g/dL	11,5 – 15,5
Hematócrito	<u>162</u>	%	34,0 – 46,0
VCM	<u>61,4</u>	fL	80,0 – 100,0
HCM	<u>15,5</u>	pg	27,0 – 32,0
CHCM	<u>25,3</u>	g/dL	32,0 – 35,0
RDW	<u>22,0</u>	%	11,6 – 14,0
Plaquetas	349	10 ⁹ /L	150-400
VPM	10,2	fL	8,2 – 9,7
PDW	13,0	%	9,0 – 17,0
Plaquetócrito	0,36	%	0,17 – 0,30
Ferro sérico	15,0	µg/dL	60,0 – 180,0
Ferritina	11,9	µg/dL	11,0 – 306,8
TIBC	444,8	µg/dL	291,0 – 430,0

Observou-se o ESP ao microscópio (Figura 9):

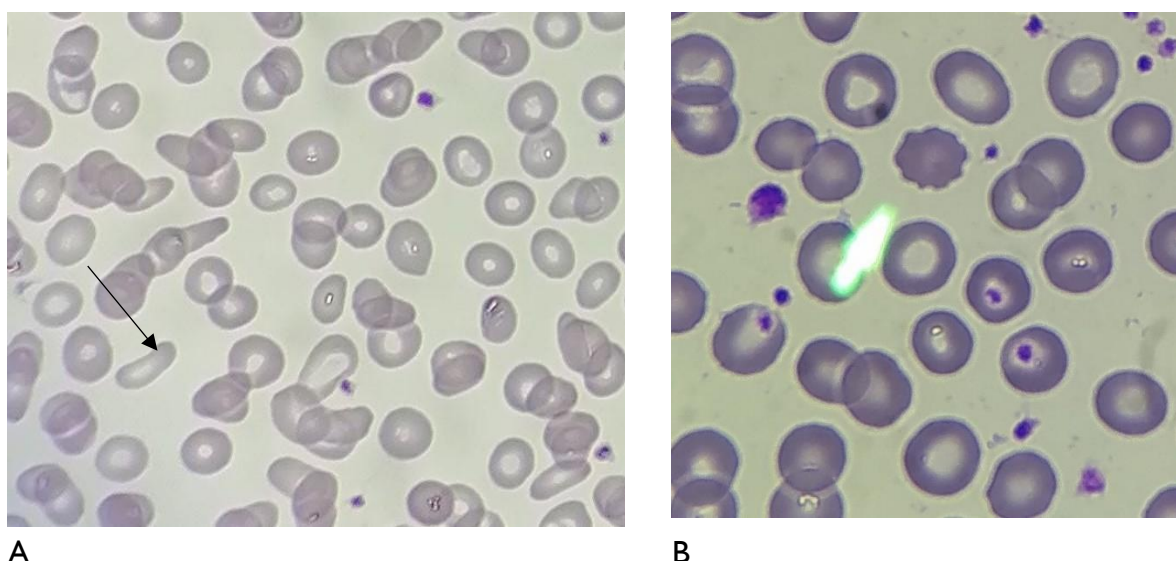


Figura 9: Imagem microscópica do ESP - Anisocitose e poiquilocitose marcadas com presença de Eliptócitos (A) e alguns equinócitos (B). Observa-se hipocromia marcada.

Através da observação dos resultados das análises laboratoriais, podemos afirmar que estamos perante um caso de anemia microcítica e hipocrômica. A observação do ESP confirmou os resultados. Os valores do ferro sérico, ferritina e capacidade de ligação do ferro (TIBC) permitem distinguir uma anemia sideropénica de anemia por doença crónica ou talassémia. Assim, os valores diminuídos do ferro sérico e ferritina com o aumento da TIBC confirmam que o diagnóstico final desta doente é uma anemia por deficiência de ferro.

Caso Clínico 2

Mulher, com 82 anos, dirigiu-se ao SU por dor, sinais inflamatórios e edema no membro inferior esquerdo, sensação de fraqueza, cansaço, sonolenta, eupneica com peles e mucosas coradas mas desidratadas. Resultados das análises laboratoriais demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8 – Resultados das análises laboratoriais

Parâmetros	Resultados	Unidades	Gama de referência
Leucócitos	<u>54,27</u>	10 ⁹ /L	4,0 – 10,0
Neutrófilos	<u>1,09</u>	10 ⁹ /L	1,5 – 7,0
Linfócitos	<u>48,84</u>	10 ⁹ /L	1,0 – 3,7
Monócitos	<u>1,63</u>	10 ⁹ /L	0,0 – 0,7
Eosinófilos	0	10 ⁹ /L	0,0 – 0,4
Basófilos	0	10 ⁹ /L	

Eritrócitos	3,87	$10^{12}/L$	
Hemoglobina	12,7	g/dL	11,5 – 15,5
Hematócrito	39,4	%	34,0 – 46,0
VCM	101,8	fL	80,0 – 100,0
HCM	32,8	pg	27,0 – 32,0
CHCM	32,2	g/dL	32,0 – 35,0
RDW	13,7	%	11,6 – 14,0
Plaquetas	<u>67</u>	$10^9/L$	150-400
VPM	11,8	fL	8,2 – 9,7
PDW	14,6	%	9,0 – 17,0
Plaquetócrito	0,08	%	0,17 – 0,30

Observou-se o ESP ao microscópio (Figura 10):

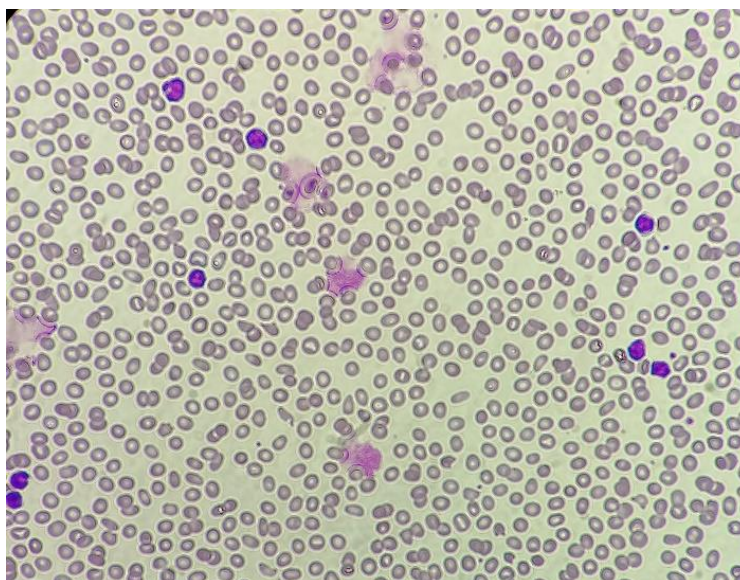


Figura 10: Imagem microscópica do ESP – Observa-se população linfocitária atípica, com relação núcleo/citoplasma aumentada. Presença de abundantes manchas de Grumpprecht (Fonte: SPC Tomar)

Através da observação do ESP e dos resultados das análises laboratoriais, provavelmente esta doente encontra-se com uma Leucemia Linfocítica Crónica, uma vez que, as manchas de Grumpprecht são muito características desta patologia, sendo este resultado confirmado por imunofenotipagem.

Caso Clínico 3

Mulher com 62 anos que realizou umas análises de rotina, não apresentava nenhum sintoma. Resultados das análises laboratoriais demonstrados na Tabela 9.

Tabela 9 – Resultados das análises laboratoriais

Parâmetros	Resultados	Unidades	Gama de referência
Leucócitos	5,81	10 ⁹ /L	4,0 – 10,0
Neutrófilos	2,37	10 ⁹ /L	1,5 – 7,0
Linfócitos	0,23	10 ⁹ /L	1,0 – 3,7
Monócitos	0,21	10 ⁹ /L	0,0 – 0,7
Eosinófilos	0	10 ⁹ /L	0,0 – 0,4
Basófilos	0	10 ⁹ /L	
Eritrócitos	5,02	10 ¹² /L	
Hemoglobina	<u>11,1</u>	g/dL	11,5 – 15,5
Hematócrito	33,7	%	34,0 – 46,0
VCM	<u>67,1</u>	fL	80,0 – 100,0
HCM	<u>22,1</u>	pg	27,0 – 32,0
CHCM	32,9	g/dL	32,0 – 35,0
RDW	14,7	%	11,6 – 14,0
Plaquetas	329	10 ⁹ /L	150 - 400
VPM	10,0	fL	8,2 – 9,7
PDW	12,9	%	9,0 – 17,0
Plaquetócrito	0,33	%	0,17 – 0,30

Observou-se o ESP ao microscópio (Figura 11) e o gráfico das eletroforeses (Figura 12):

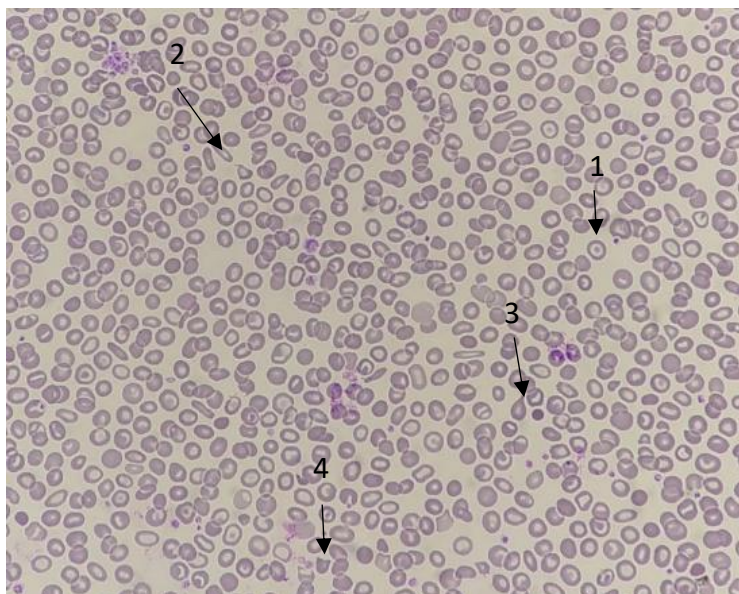


Figura 11: Imagem microscópica do ESP – Anisocitose e poiquilocitose ligeira com presença de células em alvo (1) e células alongadas(2); Raros Dacriócitos(3); visualizados 2 a 3 esquizócitos por campo(4) (Fonte: SPC Tomar)

O ESP é concordante com os resultados das análises laboratoriais - anemia microcítica e hipocrômica com ligeiro aumento do RDW.

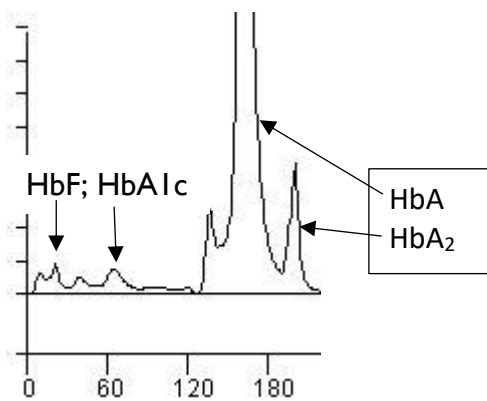


Figura 12: Gráfico da eletroforese das hemoglobinas – A HbA₂ encontra-se aumentada (Fonte: SPC Tomar)

A anemia hipocrômica e microcítica juntamente com um aumento da Hb A₂ sugeriu-se que esta doente encontra-se com uma β -talassémia menor, sendo este resultado confirmado posteriormente.

5. Imunologia e Bioquímica

No SPC a secção de Imunologia é constituída pelos equipamentos: Maglumi, Mago, Dxl 800, Image 800, Immunocap 250, Hydrasys, VIDA e a secção de bioquímica é composta por três aparelhos distintos, Unicel DxC 800, Access 2, Aution Max Ax-4280. Ou aqui ou nas metodologias deve dizer qual a metodologia de cada equipamento e que parâmetros permitem detetar.

5.1 Metodologias

5.1.1 Potenciometria

Os métodos potenciométricos são baseados na medição da diferença de potencial entre dois eléctrodos na ausência de corrente eléctrica. O eléctrodo indicador é seleccionado de maneira a que responde a alterações de uma espécie em particular presente na solução. O potencial de semi-reação não se altera no caso do eléctrodo de referência. A célula eletroquímica é então constituída por uma solução e os eléctrodos (referência e indicador) em que é medida a diferença de potencial entre os dois eléctrodos.^[17]

5.1.2 Nefelometria e Turbidimetria

A nefelometria mede o aumento da intensidade da luz dispersada por partículas suspensas numa cuvete. A fonte de luz para a taxa de nefelometria é um laser de 670nm. O

detetor está colocado num ângulo de 90° relativamente ao feixe de laser para medir a dispersão de luz.

A turbidimetria mede a diminuição da intensidade da luz enquanto passa através de uma solução de partículas dispersantes de luz numa cuvete. A fonte de luz para a taxa de turbidimetria é díodo emissor de luz (LED) com um comprimento de onda de 940nm. As medições turbidimétricas são realizadas a 0° a partir do feixe incidente.^[17]

5.1.3 Imunoensaios

Os imunoensaios são técnicas que visam a deteção do complexo antigénio-anticorpo através de diferentes metodologias conforme o princípio e forma de deteção.

Os métodos imunoquímicos são subdivididos nos métodos com observação direta do complexo antigénio-anticorpo e em métodos em que a deteção desse complexo implica a marcação de um dos componentes. Os compostos utilizados como marcadores podem ser radio-isótopos, enzimas, fluoróforos e quimioluminescentes.^[37]

- Métodos que envolvem a marcação de um dos componentes:

Imunoensaio Enzimático

Os métodos imunoenzimáticos permitem a deteção do complexo antigénio-anticorpo através da utilização de uma enzima. A principal enzima utilizada é a fosfatase alcalina.

O método ELISA envolve a fixação do anticorpo específico à superfície sólida, seguido da adição da amostra que contém o antigénio pesquisado, originando o complexo antigénio-anticorpo que fica fixos à superfície sólida, por conseguinte, todos os restantes componentes são removidos durante as lavagens. Ocorre a adição de um segundo anticorpo marcado com uma enzima, o anticorpo em excesso é removido e posteriormente adiciona-se o substrato dessa mesma enzima. O marcador enzimático catalisa a reação de hidrólise deste substrato num produto cuja quantidade é proporcional ao antigénio presente na amostra.^[37]

Imunofluorescência Indireta

Os imunoensaios fluorescentes usam fluoróforos como marcadores para a deteção do complexo ag-ab. Os fluoróforos requerem energia de luz de comprimento de onda específico, emitindo radiação de maior comprimento de onda quando regressam ao estado basal. A leitura é efetuada através de microscopia de fluorescência, sendo que a sua sensibilidade pode diminuir devido à fluorescência de fundo inespecífica presente nas amostras biológicas.^[37]

Quimioluminescência

Os imunoenaios quimioluminescentes usam compostos quimioluminescentes como marcadores. Os compostos quimioluminescentes incluem moléculas sintetizadas quimicamente, bem como produtos naturais. Ao contrário dos fluoróforos, na maioria dos compostos quimioluminescentes a emissão de luz ocorre como resultado de uma reação química.^[37]

5. Caso Clínico

Mulher com 35 anos, deu entrada no SU, apresentava-se com um cansaço extremo, sonolência, aumento de peso e queda de cabelo. Resultados das análises laboratoriais demonstrados na Tabela 10.

Tabela 10 – Resultados das análises laboratoriais

Parâmetro	Resultado	Gama de referência
T4	0,5	0,6–1,1
TSH	8	0,38–5,33
Anti-TPO	135	0-9
TRab	0,25	0-9

Através dos resultados das análises dos parâmetros T4 e TSH, suspeita-se de um caso de hipotireoidismo primário. A adenohipófise é responsável pela libertação de hormonas tróficas que atuam na glândula alvo no sentido de serem libertadas as hormonas T3 e T4.

Neste caso, a adenohipófise está a responder normalmente, visto que, a TSH se encontra aumentada para compensar a diminuição de T4 e T3. Trata-se de uma disfunção a nível da glândula periférica que não responde ao estímulo da TSH.

A presença de anticorpos anti-TPO positivos é suficiente para o diagnóstico de patologia autoimune da tiroide – Tiroidite de Hashimoto.

6. Conclusão

O Mestrado em Análises Clínicas (MAC) permitiu-me adquirir competências e consolidar outras já adquiridas durante a licenciatura. O estágio que integra este Mestrado possibilita uma experiência bastante enriquecedora, no qual tive oportunidade de desenvolver diversas tarefas de forma autónoma.

Durante o estágio tive a oportunidade de acompanhar os TSS e os MPC na validação dos resultados obtidos nas diversas áreas laboratoriais, onde pude interligar com os conhecimentos previamente adquiridos durante o MAC.

Assim, considero que alcancei os objetivos que me foram propostos, desde a integração às diversas tarefas realizadas diariamente.

Referências Bibliográficas

1. CROXATTO, Antony; PROD'HOM, Guy; GREUB, Gilbert - Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiol.** 36:2 (2012) 380–407.
2. BIOMERIEUX - **Portal Biomerieux** [Consult. 18 mai 2021]. Disponível em: <https://www.biomerieux.pt>.
3. APPELBAUM, P. C. *et al.* - Enhanced detection of bacteremia with a new BACTEC resin blood culture medium. **Journal of Clinical Microbiology.** 17:1 (1983) 48–51.
4. CHMT - **Instrução de Trabalho. Colorações Automática e Manual. IT.SPC.034.00.2014.** Tomar : [s.n.]
5. CHMT - **Instrução de Trabalho. Culturas Primárias. IT.SPC.038.00.2014.** Tomar : [s.n.]
6. CHMT - **Instrução de Trabalho. Prova de Sensibilidade à optoquina. IT.SPC.041.00.2014.** Tomar : [s.n.]
7. FONSECA, A. B. Et Al. - **Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia.** 1. ed. Lisboa : Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2004
8. SADEK, Mustafa; POIREL, Laurent; NORDMANN, Patrice - Rapid detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas* spp. using the NitroSpeed-Carba NP test. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.** 99:3 (2021) 132–165.
9. BABADY, Esther; PRITT, Bobbi S. - Parasitology. Em RIFAI, NADER (Ed.) - **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.** Sixth Edit ed. Missouri : Elsevier, 2017. ISBN 9780323359214. p. 1740-1740e.125.
10. CAUFIELD, Adam J. *et al.* - Mycobacteriology. Em RIFAI, NADER (Ed.) - **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.** Sixth Edit ed. Missouri : Elsevier, 2017. ISBN 9780323359214. p. 1738-1738.e21.
11. SAKASHITA, Kentaro *et al.* - Ultrasensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of MPT64 secretory antigen to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* viability in sputum. **International Journal of infectious diseases.** 96:1 (2020) 244–253.
12. BD - **Portal da BD** [Consult. 10 jun. 2021]. Disponível em: <https://www.bd.com/pt-br/our-products/diagnostics-systems/microbiology-testing/bactec-mgit-960-and-320>.

13. VAJPAYEE, Neerja; GRAHAM, Susan S.; BEM, Sylva - Basic Examination of Blood and Bone Marrow. Em MCPHERSON, RICHARD (Ed.) - **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. Twenty Th ed. Philadelphia : Elsevier, 2016. ISBN 9780323295680. p. 509–535.
14. MCNAMARA, Christopher - Collection and Handling of Blood. Em BAIN, BARBARA J. (Ed.) - **Dacie and Lewis Practical Haematology**. Twelfth Ed ed. London : Elsevier, 2017. ISBN 9780702066962. p. 1–7.
15. LIFSHITZ, Mark S. - Preamalysis. Em MCNAMARA, CHRISTOPHER (Ed.) - **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. Twenty-Thi ed. Philadelphia : [s.n.]. ISBN 9780323295680. p. 20-32.e1.
16. BRIGGS, Carol; BAIN, Barbara J. - Basic Haematological Techniques. Em BAIN, BARBARA J. (Ed.) - **Dacie and Lewis Practical Haematology**. Twelfth Ed ed. London : [s.n.]. ISBN 9780702066962. p. 18–49.
17. PINCUS, Matthew R.; LIFSHITZ, Mark S.; BOCK, Jay L. - Analysis: Principles of Instrumentation. Em MCNAMARA, CHRISTOPHER (Ed.) - **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. Twenty-Thi ed. Philadelphia : Elsevier, 2017. ISBN 9780323295680. p. 33-59.e1.
18. SYSMEX - **Portal da Sysmex** [Consult. 16 jun 2021]. Disponível em: <https://www.sysmex.es/n/es-pt/academia/knowledge-centre/tecnologia/citometria-de-fluxo-com-fluorescencia.html>.
19. SYSMEX - **Portal da Sysmex** [Consult. 22 jun 2021]. Disponível em: <https://www.sysmex.es/n/es-pt/academia/knowledge-centre/tecnologia/metodo-de-detecao-sls.html>.
20. SEBIA - **Portal da Sebia** [Consult. 5 jul 2021]. Disponível em: <https://www.sebia.com/pt-pt/technologies/eletroforese-em-gel/>.
21. CHMT - **Instrução de trabalho. Preparação de esfregaço para coloração. IT.SPC.033.00.2014**. Tomar : [s.n.]
22. **Esfregaço de sangue periférico** - [Consult. 25 set. 2021]. Disponível em: <http://hemocitologia.blogspot.com/2010/08/esfregaco-do-sangue-periferico.html>).
23. BAIN, Barbara J. - Preparation and Staining Methods for Blood and Bone Marrow Films. Em BAIN, BARBARA J. (Ed.) - **Dacie and Lewis Practical Haematology**. Twelfth Ed ed. London : Elsevier, 2017. ISBN 9780702066962. p. 50–60.
24. BAIN, Barbara J. - Blood Cell Morphology in Health and Disease. Em BAIN, BARBARA

- J. (Ed.) - **Dacie and Lewis Practical Haematology**. Twelfth Ed ed. London : Elsevier, 2017. ISBN 9780702066962. p. 61–92.
25. BAIN, Barbara J. - The Peripheral Blood Smear. Em **Goldman-Cecil Medicine**. Twenty Six ed. Philadelphia : Elsevier, 2020. p. 1020-1027.e2.
26. CHERNECKY, Cynthia; BERGER, Barbara - Laboratory Tests and Diagnostic Procedures. Em **Laboratory Tests and Diagnostic Procedures**. ISBN 9781455706945. p. 993–1052.
27. LONG, Sarah S.; VODZEK, Jennifer - Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. Em LONG, SARAH S.; PROBER, CHARLES G.; FISCHER, MARC (Eds.) - **Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases**. Fifth Edit ed. Philadelphia : Elsevier, 2018. ISBN 9780323401814. p. 1447–1459.
28. DGS - **Norma da Direção-Geral da saúde** atual. 2011. [Consult. 8 jul. 2021]. Disponível em: <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0332011-de-30092011-atualizada-a-06122012-jpg.aspx>.
29. MD, S. David Hudnall - Hemoglobinopathy. Em S. DAVID HUDNALL, MD (Ed.) - **Hematology**. 1. ed. Philadelphia : Elsevier, 2012. ISBN 9780323043113. p. 27–32.
30. SEBIA - **Portal da Sebia** [Consult. 20 jul. 2021]. Disponível em: <https://www.sebia.com/pt-pt>.
31. MANNING, Michael A. Laffan E Richard A. - Investigation of Haemostasis. Em BAIN, BARBARA J. (Ed.) - **Dacie and Lewis Practical Haematology**. Twelfth Ed ed. London : Elsevier, 2017. ISBN 9780702066962. p. 366–409.
32. HIGGINS, Russell A.; KITCHEN, Steve; CHEN, Dong - Hemostasis. Em RIFAI, NADER (Ed.) - **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. Sixth Edit ed. Missouri : Elsevier, 2018. ISBN 9780323359214. p. 1732-1732.e56.
33. NAPOLITANO, Mariasanta; SCHMAIER, Alvin H.; KESSLER, Craig M. - Coagulation and Fibrinolysis. Em MCPHERSON, RICHARD A. (Ed.) - **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. Twenty-Third ed. Missouri : Elsevier, 2017. ISBN 9780323295680. p. 794-811.e3.
34. CHMT - **Instrução de trabalho. Controlo de Qualidade Interno. IT.SPC. 008.01.2016**. Tomar : [s.n.]
35. MILLER, W. Greg - Quality Control. Em MCPHERSON, RICHARD A. (Ed.) - **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. Twenty-Third ed.

Missouri : Elsevier, 2017. ISBN 9780323295680. p. 112-129.e1.

36. CHMT - **Instrução de trabalho. Recepção, processamento e avaliação de amostras de controlo de qualidade externo. IT.SPC.028.0.2016.** Tomar : [s.n.]
37. AOYAGI, Katsumi; ASHIHARA, Yoshihiro; KASAHARA, Yasushi - Immunoassays and Immunochemistry. Em MCPHERSON, RICHARD A. (Ed.) - **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods.** Twenty-Third ed. Missouri : Elsevier, 2017. ISBN 9780323295680. p. 862-889.e2.