



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Rita Dias da Silva

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas orientado pelo Doutor Américo Lopes de Freitas e pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos Silva e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Julho de 2023



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Rita Dias da Silva

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

**Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas
orientado pelo Doutor Américo Lopes de Freitas e pela Professora Doutora Ana
Miguel Duarte Matos Silva e apresentado à Faculdade de Farmácia da
Universidade de Coimbra.**

Julho de 2023

Agradecimentos

Agradeço à Professora Ana Miguel Matos, coordenadora do Mestrado em Análises Clínicas e minha orientadora interna, por tornar este estágio possível, e por todo o tempo dispensado no esclarecimento de dúvidas e na revisão do presente relatório.

Ao Doutor Américo Freitas, meu orientador externo, por me dar a oportunidade de estagiar no seu laboratório, e por toda a ajuda e conhecimentos transmitidos.

Agradeço a toda a equipa do Laboratório Avelab por me terem recebido de braços abertos durante estes seis meses, e por toda a formação profissional, bem como pessoal proporcionadas.

Aos meus pais pela paciência e apoio incondicional durante o meu percurso académico, que sem eles não seria possível.

Agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, tornaram possível a conclusão desta etapa.

Índice

Lista de abreviaturas	ix
Índice de figuras	xiii
Índice de tabelas	xiv
Resumo	xv
Abstract	xvii
1. Introdução	1
2. Caracterização do laboratório de estágio	2
a. Fluxo de trabalho no laboratório	2
b. Controlo da qualidade	3
i. Controlo da Qualidade Interno	3
ii. Avaliação Externa da Qualidade	4
3. Bioquímica	5
4. Imunologia	7
5. Hematologia	9
a. Hemograma	9
i. Eritrograma	9
1. Contagem de eritrócitos	9
2. Concentração de hemoglobina	10
3. Hematócrito	10
4. Índices eritrocitários	10
5. Reticulócitos	11
ii. Leucograma	11
iii. Trombocitograma	12
b. Esfregaço de sangue periférico	12
c. Velocidade de sedimentação	13
d. Hemoglobina glicada	13
e. Estudo das hemoglobinas	14
f. Hemostase	14
i. Testes de <i>screening</i> da coagulação	14
1. Tempo de Protrombina	15
2. Tempo de Tromboplastina Parcialmente ativada	15
3. Fibrinogénio	16

i.	D-dímeros	16
ii.	Pesquisa de crioaglutininas	16
g.	Imunohematologia	17
i.	Determinação do grupo sanguíneo	17
ii.	Teste de Coombs direto	17
iii.	Teste de Coombs indireto	18
6.	Microbiologia	19
a.	Urina	19
i.	Análise sumária de urina	20
ii.	Sedimento urinário	20
iii.	Exame cultural	21
b.	Fezes	22
i.	Exame bacteriológico das fezes	22
ii.	Exame micológico das fezes	24
iii.	Exame parasitológico das fezes	24
iv.	Pesquisa de antígeno de <i>Helicobacter pylori</i>	24
v.	Pesquisa de antígeno de <i>Giardia</i>	25
vi.	Pesquisa de antígeno de Adenovírus e Rotavírus	25
c.	Exsudados vaginais	26
i.	Exame bacteriológico, micológico e parasitológico	26
ii.	Pesquisa de <i>Streptococcus</i> β -hemolíticos do grupo B	27
iii.	Painel molecular de ISTs	28
d.	Exsudados uretrais	29
e.	Secreções respiratórias	29
i.	Exsudados nasais	30
1.	Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i>	30
2.	Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina-resistente (MRSA)	30
ii.	Pesquisa molecular de SARS-CoV-2	31
iii.	Exsudados orofaríngeos	31
1.	Exame bacteriológico	32
2.	Pesquisa de antígeno de <i>Streptococcus</i> β -hemolíticos do grupo A	32
iv.	Expectoração	32
1.	Pesquisa de micobactérias	33

f. Exsudados purulentos	33
g. Hemocultura	34
h. Fragmentos de unha	35
i. Identificação de microrganismos	35
i. Provas bioquímicas	35
1. Teste da catalase	35
2. Teste da coagulase	35
3. Teste da oxidase	36
ii. Identificação microbiana automatizada	36
j. Testes de suscetibilidade antimicrobiana	36
i. TSA manual	36
ii. TSA automatizado	37
7. Discussão de casos clínicos	38
a. Anemia ferropriva	38
b. Leucemia linfocítica crónica	42
c. Candidíase vulvovaginal e vaginose bacteriana	46
d. Infecção por <i>Staphylococcus aureus</i>	49
8. Conclusão	52
9. Referências bibliográficas	53

Lista de abreviaturas

Ac – Anticorpo

AFP – Alfa-I Fetoproteína

Ag – Antigénio

ALT – Alanina Transferase

AST – Aspartato Transferase

β-hCG – Fração beta da Gonadotrofina Coriónica Humana

C3 – Componente 3 do complemento

C4 – Componente 4 do complemento

CA – *Carbohydrate Antigen*

CEA – *Carcinoembryonic Antigen*

CD – *Cluster of Differentiation*

CHGM – Concentração de Hemoglobina Globular Média

CLED – Cistina Lactose Deficiente em Electrólitos

CMI – Concentração Mínima Inibitória

CMV – Citomegalovírus

CK – *Creatine Kinase*

del – Deleção

DHEA-S – Dihidroepiandrosterona-sulfato

EDTA K3 – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético Tripotássico

EUCAST – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FISH – *Fluorescence in situ Hybridization*

FSH – *Follicle-stimulating Hormone*

Gama-G.T. – Gama Glutamiltransferase

Hb – Hemoglobina

HB – Hepatite B

HCV – Vírus da Hepatite C

HDL – *High-density Lipoprotein*

HGM – Hemoglobina Globular Média

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HPLC –*High-performance Liquid Chromatography*

Ig – Imunoglobina

INR –*International Normalized Ratio*

ISO – *International Standard*

ITU – Infecção do Trato Urinário

LDH – Lactato Desidrogenase

LDL –*Low-density Lipoprotein*

LH –*Luteinizing Hormone*

LLC – Leucemia Linfocítica Crónica

MRSA – *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

CRP – *C-reactive Protein*

PCR –*Polymerase Chain Reaction*

PDW – *Platelet Distribution Width*

PNAEQ – Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade Laboratorial

PSA – *Prostate-specific Antigen*

PTH – Paratormona

RDW –*Red Cell Distribution Width*

Rh – Rhesus

RIQAS – *Randox International Quality Assessment Scheme*

RNA – *Ribonucleic Acid*

RT – *Reverse Transcriptase*

s – Superfície

SARS-CoV-2 – Coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave

SS – *Salmonella-Shigella*

SCCmec – Cassete cromossómica estafilocócica

T3 – Triiodotironina

T4 – Tiroxina

TIBC – *Total Iron-binding Capacity*

Tg – Tiroglobulina

TP – Tempo de Protrombina

TPHA – *Treponema pallidum Hemagglutination Assay*

TPO – Peroxidase

TSA – Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana

TSH – *Thyroid-stimulating Hormone*

TTPa – Tempo de Tromboplastina Parcialmente ativada

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

UK NEQAS – *United Kingdom National External Quality Assessment Scheme*

VDRL – *Venereal Disease Research Laboratory*

VGM – Volume Globular Médio

VPM – Volume Plaquetar Médio

VS – Velocidade de Sedimentação

Índice de figuras

Figura 1: Exemplos de uroculturas de <i>E. coli</i> (A), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (B) e <i>Proteus mirabilis</i> (C). (Fotos tiradas no laboratório)	21
Figura 2: Exemplos de pesquisa de <i>Streptococcus</i> β -hemolíticos do grupo B negativa (A) e positiva (B). (Fotos tiradas no laboratório)	28
Figura 3: Esfregação de sangue periférico (ampliação de 1000x). (Fotos tiradas no laboratório)	39
Figura 4: Campo observado do esfregação de sangue periférico (A) com detalhes das células e artefactos encontrados (B e C) (ampliação de 500x). (Fotos tiradas no laboratório)	43
Figura 5: Meios de cultura semeados. (A) Gelose de chocolate; (B) Meio de Sabouraud; (C) Meio CandiSelect. (Fotos tiradas no laboratório)	46
Figura 6: Meios de cultura semeados. (A) Gelose de sangue; (B) Gelose de Chapman; (C) Meio de CLED; (D) Gelose de MacConkey. (Fotos tiradas no laboratório)	49

Índice de tabelas

Tabela I: Parâmetros químicos analisados no Alinity ci-series (Abbott Diagnostics).	6
Tabela II: Parâmetros imunológicos analisados no Alinity ci-series (Abbott Diagnostics). . .	7
Tabela III: Testes serológicos manuais e respectiva aplicação, metodologia e kit.	8
Tabela IV: Cartas utilizadas pelo VITEK® 2 Compact (bioMérieux) e as suas aplicações. . .	37
Tabela V: Resultados obtidos na Hematologia.	38
Tabela VI: Resultados obtidos na Bioquímica.	38
Tabela VII: Resultados obtidos na Hematologia.	42
Tabela VIII: Resultados obtidos na Bioquímica.	42
Tabela IX: Estadiamento da LLC segundo a classificação de Rai. Adaptado de (Hoffbrand et al., 2016).	45

Resumo

O presente relatório é referente ao estágio curricular realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. O estágio teve lugar no Avelab – Laboratórios Médicos de Análises Clínicas entre dezembro de 2022 e junho de 2023.

As análises clínicas posicionam-se como uma área da maior importância no diagnóstico, tratamento e seguimento dos utentes. A crescente procura de exames laboratoriais fomenta o desenvolvimento do setor, existindo uma grande aposta em equipamentos laboratoriais que agilizem os procedimentos analíticos, contudo, os laboratórios continuam fortemente dependentes de técnicos qualificados que assegurem a qualidade dos resultados.

Neste relatório, é feita uma breve descrição do processamento de amostras na rotina laboratorial desde a sua receção, passando pela triagem, preparação das amostras e processamento analítico das mesmas, até à validação dos resultados obtidos. As áreas laboratoriais de Bioquímica e de Imunologia serão abordadas de forma sucinta, sendo referidas apenas as análises efetuadas nestas áreas, enquanto que as valências de Hematologia e de Microbiologia serão desenvolvidas com maior detalhe, focando, essencialmente, as metodologias utilizadas e os seus princípios. Todavia, nestas áreas mais aprofundadas será também dado um enquadramento teórico sintético acerca da aplicação de cada teste realizado num contexto de diagnóstico clínico. Por fim, este relatório encerra ainda o relato e a discussão de alguns casos clínicos de interesse que surgiram durante este estágio.

Palavras-chave: Análises Clínicas; Hematologia; Microbiologia; Avelab; Rotina laboratorial.

Abstract

This report refers to 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. The internship took place at Avelab - Laboratórios Médicos de Análises Clínicas between December 2022 and June 2023.

Clinical analysis positions itself as an area of major importance in the diagnosis, treatment and follow-up of patients. The growing demand for laboratory tests fosters the development of the sector, with a great investment in laboratory equipment that speeds up analytical procedures, however, laboratories remain heavily dependent on qualified technicians to ensure the quality of the results.

In this report, a brief description of the processing of samples in the laboratory routine is given, from their reception, through triage, sample preparation and analytical processing, to the validation of the results obtained. The laboratory areas of Biochemistry and Immunology will be briefly addressed, with only the analyses performed in these areas being mentioned, while the Hematology and Microbiology fields will be developed in greater detail, focusing essentially on the methodologies used and their principles. However, in these more in-depth areas, a synthetic theoretical background will also be given on the application of each test performed in a clinical diagnostic context. Finally, this report concludes with the report and discussion of some clinical cases of interest that arose during this internship.

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

I. Introdução

O presente relatório visa apresentar as atividades realizadas durante o estágio curricular inserido no Mestrado em Análises Clínicas. O estágio teve lugar no Avelab – Laboratórios Médicos de Análises Clínicas, e teve a duração aproximada de seis meses.

No decorrer deste estágio, tive a oportunidade de integrar a equipa técnica dos diferentes setores, onde me foi possível executar atividades da rotina laboratorial e aplicar os conhecimentos teóricos obtidos durante o mestrado. Acompanhei todo o processo analítico desde a receção das amostras, passando pela triagem, preparação das amostras e processamento analítico das mesmas, até à validação dos resultados.

Apesar de ter percorrido e ir abordar todas as valências das Análises Clínicas, neste relatório, retratarei as áreas de Bioquímica e de Imunologia de modo mais resumido. Assim, apenas irei desenvolver mais detalhadamente as áreas de Hematologia e de Microbiologia. Nestas áreas, pretendo enumerar os testes testemunhados ao longo do estágio, dando um breve enquadramento teórico acerca da sua aplicação num contexto de diagnóstico. Nestas áreas mais aprofundadas, procuro ainda descrever de forma sucinta o princípio das metodologias utilizadas. Por último, irei relatar e discutir alguns casos clínicos de interesse que surgiram no decorrer do estágio.

2. Caracterização do laboratório de estágio

O Avelab é um laboratório médico de análises clínicas privado e independente sob a direção clínica do Dr. Américo Freitas. Desde a sua fundação em 1956, tem permanecido em constante expansão, contando já com mais de 100 postos de colheita espalhados pelas regiões norte e centro do país, para além do laboratório central localizado em Aveiro na Rua Cerâmica do Vouga, nº 13. Atualmente, o Avelab reúne uma equipa com cerca de 150 funcionários integrada por médicos e farmacêuticos especialistas em análises clínicas, técnicos superiores de laboratório, e ainda, pessoal administrativo.

O Avelab realiza análises nas áreas da Bioquímica, Endocrinologia, Hematologia, Imunologia, Alergologia, Microbiologia, Serologia e Biologia Molecular, servindo cerca de 800 utentes diariamente. O laboratório possui também parcerias com hospitais privados e com empresas de Medicina no trabalho, dispondo ainda do serviço de colheitas ao domicílio.

2. a. Fluxo de trabalho no laboratório

A fase pré-analítica engloba todo o processo desde a requisição da análise pelo clínico até à preparação da amostra imediatamente antes da fase instrumental. As diferentes etapas abrangem vários profissionais cujas diferentes funções apresentam um reduzido grau de automatização. Isto resulta em inúmeras variáveis que tornam esta fase altamente suscetível a erros.

Após fornecer as devidas informações ao utente para as análises requisitadas, procede-se à confirmação da requisição. Antes da colheita, são confirmados os dados do utente e se este reúne as condições necessárias à colheita, como o jejum, por exemplo. Depois da entrega das amostras colhidas pelo utente, tais como urina e fezes, o técnico procede à colheita dos produtos biológicos pedidos. É atribuída uma etiqueta a cada amostra, estando a esta associada uma código alfanumérico que identifica o processo, bem como um código de barras que facilita a leitura pelos autoanalisadores, e ao qual estão associados os parâmetros requisitados.

As amostras provenientes dos postos de colheita chegam ao laboratório central em malas térmicas através de estafetas. As amostras são direcionadas à triagem onde se dá a entrada das mesmas no sistema informático. Na triagem, é avaliada a adequação da amostra quanto à sua qualidade e quantidade, e são registadas possíveis interferências, como amostras hemolisadas ou lipémicas. Procede-se à centrifugação das amostras, quando aplicável, e à separação de alíquotas para o exterior. O Avelab tem protocolos com laboratórios externos

como o Ambar Lab de Barcelona e o laboratório Cerba Internacional de Barcelona. Por fim, as amostras são distribuídas pelos vários setores.

A fase analítica está bastante automatizada, o que permite o processamento do elevado número de amostras em tempo útil. Após a entrada destas no sistema informático e após o devido controlo de qualidade, as amostras são analisadas a fim de conseguir valores fidedignos.

Os resultados obtidos sofrem uma validação analítica pelo técnico de acordo com os valores de referência e com o histórico disponível. São também efetuadas repetições na mesma amostra ou numa nova amostra, conforme apropriado. Os valores são integrados no boletim de resultados, e são novamente validados por um Farmacêutico especialista ou por um Médico especialista. Esta validação biopatológica considera o conjunto das análises realizadas nas diferentes áreas com o quadro clínico, quando este se encontra disponível.

O armazenamento e a eliminação das amostras são efetuados de forma informatizada e sistematizada para uma procura facilitada de amostras. A eliminação de resíduos é realizada de acordo com o Despacho nº 242/96 do Ministério de Saúde (1996).

O laboratório tem à disposição o sistema informático *Appolo* que harmoniza todo o processo de análise. Compreende os postos de colheita, agiliza a validação dos resultados, permite o acesso ao histórico dos utentes, a rastreabilidade das amostras, e a deteção de análises não realizadas, bem como de produtos em falta.

2. b. Controlo de qualidade

O controlo da qualidade laboratorial é essencial para a consistente obtenção de resultados que reflitam o verdadeiro estado de saúde dos utentes. Para garantir a precisão dos resultados, o laboratório implementa diariamente o Controlo de Qualidade Interno. Com vista a alcançar resultados exatos, o Avelab integra vários programas de Avaliação Externa da Qualidade. Certificado pela norma NP EN ISO 9001:2015, o laboratório dispõe de um sistema de gestão da qualidade que assegura a melhoria contínua, e que atesta a qualidade dos serviços prestados.

2. b. i. Controlo de Qualidade Interno

A execução das análises propriamente dita é a fase do processo analítico que apresenta um controlo mais extensivo e rigoroso.

Os controlos comerciais são analisados, sendo utilizado um mínimo de dois níveis de concentração, um nível fisiológico e um patológico. A frequência com que é efetuada a análise

destes controlos varia consoante o equipamento. Com os resultados dos controlos, são construídos os gráficos de Levey-Jennings, onde é averiguado o cumprimento das regras de Westgard. No caso de observação de não conformidades, é determinada a causa destas, a fim de se tomarem ações corretivas, tais como, a calibração do reagente em questão. O controlo é repetido, e após nova análise da carta de controlo e confirmação da conformidade desta com as regras de Westgard, podem-se processar as amostras dos utentes.

Os equipamentos estão sujeitos a calibrações periódicas, e ainda quando se verifica mudança de lote dos reagentes ou quando ocorre a violação das regras de Westgard, como supramencionado.

2. b. ii. Avaliação Externa da Qualidade

Com uma frequência definida, o laboratório recebe amostras de concentração desconhecida que são processadas de forma habitual juntamente com as amostras dos utentes. Os resultados obtidos são reportados à entidade responsável, que os irá analisar. É emitido um relatório de avaliação do desempenho do laboratório em comparação com o valor real, e com outros laboratórios que usam a mesma metodologia e/ou equipamento. Se necessário, o método é revisto e são implementadas medidas de melhoria.

O Avelab participa em vários programas de avaliação externa: RIQAS (*Randox International Quality Assessment Scheme*), UK NEQAS (*United Kingdom National External Quality Assessment Scheme*) e PNAEQ (Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade Laboratorial), coordenado pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

3. Bioquímica

Trata-se de uma área de manifesta relevância clínica, já que permite a avaliação das funções renal, cardiovascular, hepática e pancreática. A bioquímica compreende também vários testes que complementam o diagnóstico das restantes valências analíticas. Por estes motivos, figura como a área com maior volume de amostras.

A amostra mais utilizada é o soro obtido a partir do sangue colhido em tubo com ativador de coágulo e gel separador. A urina é também uma amostra comum nesta área, tanto a urina ocasional, como a urina das 24 horas.

Atualmente, as análises bioquímicas são realizadas de forma automatizada. O Avelab dispõe do autoanalisador Alinity ci-series (Abbott Diagnostics, Abbott Park, Illinois, E.U.A.) que processa os testes bioquímicos no módulo da química de acordo com os princípios de fotometria e de potenciometria. Os parâmetros séricos e urinários analisados são enumerados na Tabela I acompanhados da respetiva metodologia utilizada na sua determinação.

Para uma melhor interpretação dos resultados obtidos, o autoanalisador fornece uma indicação dos índices de hemólise, icterícia e lipémia nas amostras de soro. Deste modo, é possível identificar alterações ocasionadas por estas interferências, e pedir a repetição da colheita quando adequado.

Dada a forte automatização deste setor, os diferentes parâmetros são calibrados e controlados frequente e metodicamente, com o objetivo de minimizar os erros analíticos. Durante a validação dos resultados, são tidos em especial atenção valores inconsistentes com o restante quadro analítico, sendo estas amostras frequentemente repetidas após nova calibração e/ou controlo do parâmetro em questão. São também levados em conta valores que ultrapassem o limite máximo do intervalo de linearidade de determinado parâmetro. Neste caso, as amostras são sujeitas a uma diluição manual ou pelo equipamento, e o teste é repetido. Tudo isto é realizado tendo em vista a obtenção de resultados fidedignos.

Na valência da Bioquímica, é também realizada a eletroforese de proteínas no soro e na urina no equipamento Capillary[®] 2 (Sebia, Issy-les Moulinaux, França). Este teste permite o rastreio de alterações do perfil proteico através da separação das proteínas segundo o princípio da eletroforese capilar. É, por isso, utilizado no diagnóstico e monitorização de uma vasta seleção de patologias crónicas, nomeadamente, gamopatias monoclonais.

Para além destes ensaios automatizados, realizam-se ainda técnicas manuais que usam a urina como amostra, como o teste de gravidez e a deteção de drogas de abuso. Ambos os testes baseiam-se no princípio do *Lateral Flow Assay*, e o laboratório utiliza os kits NADAL® hCG Teste de Gravidez (nal von minden GmbH, Regensburg, Alemanha) e SureStep™ Urine Drug Screen Test (Abbott®), respetivamente.

Pode ainda ser realizada a deteção do gene HLA-B27 por reação da polimerase em cadeia (PCR) em tempo real. Este teste é realizado em casos suspeitos de espondiloartropatias, nomeadamente, espondilite anquilosante. A extração dos ácidos nucleicos realiza-se no extrator GenoXtract® (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Alemanha), e a amplificação é executada no termociclador FluoroCycler® XT (Hain Lifescience GmbH).

Tabela I: Parâmetros químicos analisados no Alinity ci-series (Abbott Diagnostics).

	Parâmetros	Metodologia
Química sérica	α I-antitripsina, fosfatase alcalina, albumina, fosfatase ácida, alanina transaminase, amilase, anti-estreptolisina O, aspartato transaminase, β2-microglobulina, bilirrubina direta, bilirrubina total, cálcio, C3, C4, colesterol total, creatinase, creatinina, proteína C reativa ultrasensível, digoxina, colesterol LDL, γ-glutamyl-transferase, glucose, IgA, IgM, IgG, ferro, lactato desidrogenase, lipase, lítio, magnésio, fenobarbital, fenotoína, fósforo, proteínas totais, fator reumatóide, transferrina, triglicerídeos, capacidade total de fixação do ferro, colesterol HDL, ureia, ácido úrico, ácido valpróico.	Fotometria
	Sódio, potássio, cloro.	Potenciometria
Química urinária	Amilase, cálcio, glucose, creatinina, magnésio, microalbuminúria, fósforo, proteínas, ureia, ácido úrico.	Fotometria
	Sódio, potássio, cloro.	Potenciometria

4. Imunologia

A Imunologia avalia a função tiroideia, determina as hormonas da reprodução, bem como os marcadores tumorais, e fornece outros dados essenciais ao diagnóstico de uma variedade de patologias. Esta valência engloba ainda os testes serológicos e a pesquisa de sangue oculto nas fezes que se baseiam em princípios imunológicos.

O soro figura como a amostra de excelência desta área, sendo colhido em tubo com ativador de coágulo e gel separador.

A análise dos parâmetros imunológicos realiza-se no módulo de imunologia do autoanalisador Alinity ci-series (Abbott Diagnostics) já referido. O equipamento recorre a imunoensaios e utiliza a deteção quimioluminescente para a medição dos analitos. Os diferentes parâmetros estão listados na Tabela II.

Tabela II: Parâmetros imunológicos analisados no Alinity ci-series (Abbott Diagnostics).

Parâmetros	
Imunologia sérica	Anti-TPO, anti-Tg, ácido fólico, AFP, β -hCG, CA 125, CA 15-3, CA 19-9, CEA, CK-MB, cortisol, DHEA-S, estradiol, ferritina, FSH, homocisteína, insulina, PTH, LH, mioglobina, progesterona, prolactina, péptido C, PSA livre e total, T3 livre e total, T4 livre e total, TSH, testosterona total, troponina I, vitamina D, vitamina B12, HIV (anti-HIV1/2 e p24), HBsAc, HBsAg, anti-HCV IgG total, CMV IgG/M, IgG/M da Rubéola, IgG/M de <i>Toxoplasma gondii</i> .

TPO – Peroxidase; Tg – Tiroglobulina; AFP – Alfa-I fetoproteína; β -hCG – Gonadotrofina coriónica; CA – Antígeno carboidrato; CEA – Antígeno carcinoembrionário; CK – Creatina cinase; DHEA-S – Dihidroepiandrosterona-sulfato; FSH – Hormona foliculoestimulante; LH – Hormona luteinizante; PSA – Antígeno específico da próstata; PTH – Paratormona; T3 – Triiodotironina; T4 – Tiroxina; TSH – Hormona estimulante da tiróide; HIV – Vírus da imunodeficiência humana; Anti-HIV1/2 e p24 – Anticorpos anti-HIV 1 e 2 e antígeno p24; HB – Hepatite B; s – Superfície; Ac – Anticorpo; Ag – Antígeno; HCV – Vírus da hepatite C; Ig – Imunoglobina; CMV – Citomegalovírus.

Deste modo, trata-se de uma área bastante automatizada, e à semelhança da Bioquímica, os ensaios imunológicos executados no autoanalisador encontram-se igualmente sujeitos a uma calibração e controlo rigorosos.

Todavia, o laboratório recorre a técnicas manuais para levar a cabo alguns testes serológicos. Por estarem mais sujeitos a erros do operador, estes devem ser realizados com maior cuidado. Os diferentes ensaios serológicos manuais constam na Tabela III juntamente com a respetiva aplicação, metodologia e kit de reação utilizado.

Tabela III: Testes serológicos manuais e respetiva aplicação, metodologia e kit.

Teste	Aplicação	Metodologia	Kit de reação
VDRL (<i>Venereal Disease Research Laboratory</i>)	Screening de sífilis	Teste de aglutinação	NADAL [®] VDRL test (nal von minden GmbH)
TPHA (<i>Treponema pallidum hemagglutination assay</i>)	Teste confirmatório de sífilis	Teste de aglutinação	TPHA Test (Mascia Brunelli S.p.A.)
Waler Rose	Deteção do fator reumatóide	Imunocromatografia de fluxo lateral	Waler Rose Test (Mascia Brunelli S.p.A.)
Paul Bunnell	Screening de mononucleose infecciosa	Imunocromatografia de fluxo lateral	Clearview [®] IM II (Abbott [®])
<i>Helicobacter pylori</i>	Deteção de anticorpos anti- <i>Helicobacter pylori</i>	Imunocromatografia de fluxo lateral	NADAL [®] H. pylori Ab (nal von minden GmbH)
Widal	Screening de <i>Salmonella</i>	Teste de aglutinação	Salmonella Slide Test (Mascia Brunelli S.p.A.)
HCV	Screening de HCV	Imunocromatografia de fluxo lateral	Abon HCV Rapid Test (Abbott [®])

Por fim, a pesquisa de sangue oculto nas fezes é realizada em três amostras de fezes colhidas para tubos FOB Gold[®] (Sentinel Diagnostics, Milão, Itália). As amostras são processadas no analisador SENTiFIT[®] 270 (Sentinel Diagnostics) que utiliza o teste imunoquímico fecal.

5. Hematologia

A Hematologia visa o estudo dos componentes do sangue e dos órgãos hematopoiéticos responsáveis pela sua produção. Através da análise quantitativa e qualitativa das células sanguíneas e das proteínas da coagulação é possível o diagnóstico de patologias hematológicas.

Nesta valência, os parâmetros avaliados incluem o hemograma com contagem de plaquetas, a velocidade de sedimentação eritrocitária, a hemoglobina glicada e o estudo da coagulação, nomeadamente, o tempo de protrombina e o tempo de tromboplastina parcialmente ativada.

5. a. Hemograma

O hemograma constitui o pedido mais frequente neste setor, e avalia as três séries sanguíneas: vermelha, branca e plaquetar. Desta forma, surge como a base da avaliação hematológica, informando o analista e o clínico sobre o rumo a tomar em exames posteriores.

Para a determinação dos parâmetros do hemograma, o laboratório Avelab dispõe do analisador Sysmex XN-2000 (Sysmex, Kobe, Japão) que permite uma análise automatizada, agilizando o fluxo de trabalho no setor. Os valores de referência utilizados estão adaptados à idade e ao sexo do utente.

A amostra utilizada para a execução do hemograma é sangue total colhido em tubo com o anticoagulante EDTA K3. Uma vez que é necessária a análise de sangue total para a obtenção resultados representativos, deve-se proceder à homogeneização da amostra por meio de sucessivas inversões do tubo de colheita. (Bain *et al.*, 2017)

5. a. i. Eritrograma

O eritrograma integra a contagem de eritrócitos, a concentração de hemoglobina, o hematócrito, os índices eritrocitários e a contagem de reticulócitos. Esta é uma análise fundamental para a avaliação da série eritrocitária e das patologias que lhe estão associadas.

I. Contagem de eritrócitos

A contagem de eritrócitos traduz o número de eritrócitos por unidade de volume de sangue, podendo informar o clínico sobre a produção eritrocitária do indivíduo. Apesar deste valor ser de limitada importância quando avaliado isoladamente, apresenta-se como um recurso fundamental para o cálculo dos índices eritrocitários.

Este parâmetro é determinado por impedância elétrica combinada com focagem hidrodinâmica. As células atravessam individualmente uma abertura pela qual passa uma corrente direta entre dois eletrodos. Uma vez que as células sanguíneas não são condutoras de corrente elétrica, cria-se uma diferença de potencial entre os eletrodos que permite a contagem das células. (Silva *et al.*, 2016)

2. Concentração de hemoglobina

O valor analítico de hemoglobina figura como o principal indicador analítico da presença de anemia. Além disto, destaca-se pela sua relevância na determinação dos índices eritrocitários.

A determinação da hemoglobina utilizada segue o método de sulfato lauril de sódio. Este tem por base a lise dos eritrócitos, resultando na liberação da hemoglobina, e na sua consequente conversão num derivado de sulfato corado estável que é analisado fotometricamente a 555 nm. (Avcioglu *et al.*, 2017)

3. Hematócrito

O hematócrito pode ser usado como um indicador aproximado do valor de hemoglobina e, por consequência, um preditor aceitável de anemia. Surge ainda como um dos parâmetros necessários ao cálculo dos índices eritrocitários.

A medição do hematócrito é também realizada pelo princípio de impedância elétrica associada à focagem hidrodinâmica. Em adição à contagem celular, os pulsos elétricos criados permitem a determinação do volume dos eritrócitos, sendo o seu somatório indicativo do hematócrito. (Bain *et al.*, 2017)

4. Índices eritrocitários

Ao contrário dos restantes parâmetros do eritrograma, os índices eritrocitários são calculados, e não determinados diretamente. Estes apresentam uma elevada relevância clínica na classificação morfológica de anemias, e na diferenciação dos diversos mecanismos que lhes estão subjacentes.

Para o cálculo destes índices são utilizados os valores da contagem de eritrócitos, de hemoglobina e do hematócrito.

O volume globular médio (VGM) é obtido pelo quociente entre o hematócrito e o número de eritrócitos. Informa sobre o tamanho médio dos eritrócitos, classificando-os como microcíticos, normocíticos ou macrocíticos.

A hemoglobina globular média (HGM) determina-se dividindo a hemoglobina pelo número de eritrócitos. Este valor indica o conteúdo médio de hemoglobina por eritrócito.

A concentração de hemoglobina globular média (CHGM) é calculada através da divisão da hemoglobina pelo hematócrito. Indica a concentração de hemoglobina média por eritrócito, e classifica os eritrócitos como hipocrômicos ou normocrômicos.

Adicionalmente, é também calculado o índice de distribuição dos eritrócitos (RDW) que exprime o grau de anisocitose observado microscopicamente. Ou seja, trata-se de uma medida quantitativa da variação do volume dos eritrócitos. Associado a este valor é apresentada ainda uma curva de distribuição de tamanho dos eritrócitos. (Bain *et al.*, 2017)

5. Reticulócitos

A contagem de reticulócitos reflete a atividade eritropoiética do indivíduo, e permite a classificação da anemia como hipoproliferativa ou hiperproliferativa.

Os reticulócitos podem ainda ser divididos em três populações (de baixa, média e alta fluorescência) de acordo com o seu nível de maturação, isto é, segundo a quantidade de RNA presente nos reticulócitos. Estas populações possibilitam a determinação da fração de reticulócitos imaturos que funciona como um índice precoce de eritropoiese na medula óssea. (Silva *et al.*, 2016)

Estas medições são efetuadas por citometria de fluxo com fluorescência. Os ácidos nucleicos dos reticulócitos são marcados com o corante fluorescente polimetina, e a leitura da intensidade de fluorescência por um laser semiconductor é proporcional ao grau de maturação. Desta forma, é possível a diferenciação das três populações de reticulócitos. (Piva *et al.*, 2015)

5. a. ii. Leucograma

O leucograma avalia a série leucocitária, e compreende a determinação de leucócitos e a sua contagem diferencial. Esta última, para além da diferenciação de neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos, especifica ainda os granulócitos imaturos, que incluem os promielócitos, mielócitos e metamielócitos. Os valores das diferentes populações leucocitárias devem ser expressos em percentagem e em valor absoluto para uma interpretação mais exata do leucograma.

Tanto a contagem de leucócitos, como a fórmula leucocitária são determinadas por citometria de fluxo com fluorescência. As células em suspensão passam uma a uma por um

feixe luminoso, e a luz dispersada é captada por detetores a diferentes ângulos caracterizando a célula quanto à sua dimensão e complexidade. Para a leitura da fluorescência, a membrana celular é perfurada pelo reagente de lise Lysercell, mantendo contudo a estrutura celular intacta, e os ácidos nucleicos são marcados com corante fluorescente. (Bain *et al.*, 2017)

5. a. iii. Trombocitograma

A avaliação da série plaquetária é possibilitada pelo trombocitograma que engloba a contagem de plaquetas, o volume plaquetar médio e a amplitude de distribuição das plaquetas. É considerado um teste da função hemostática. (Hoffbrand *et al.*, 2016)

A contagem plaquetar pode ser determinada por impedância elétrica com focagem hidrodinâmica à semelhança da contagem de eritrócitos. No entanto, o analisador também permite a determinação por fluorescência ótica, que recorre à marcação com corante fluorescente da membrana e dos grânulos das plaquetas. O próprio analisador decide e reporta o valor mais exato entre os dois métodos de contagem. (Bain *et al.*, 2017)

Para o cálculo do volume plaquetar médio (VPM) é necessário o plaquetócrito, que corresponde ao volume ocupado pelas plaquetas, e é determinado do mesmo modo do hematócrito. Através da razão entre o plaquetócrito e o número de plaquetas é conseguido o volume plaquetar médio. (Silva *et al.*, 2016)

É obtida uma curva de distribuição de tamanho das plaquetas que permite o cálculo do índice de distribuição das plaquetas (PDW), que traduz o índice de anisocitose plaquetar. (Silva *et al.*, 2016)

5. b. Esfregaço de sangue periférico

O exame microscópico do esfregaço de sangue periférico apresenta-se como um exame complementar crucial para uma análise hematológica compreensiva. No entanto, por motivos logísticos, o esfregaço apenas é preparado numa fração das amostras em função dos resultados do hemograma. (Bain *et al.*, 2017)

Deve-se proceder à preparação do esfregaço em casos de contagens plaquetares baixas para identificar pseudotrombocitopenias devidas a uma má colheita, por visualização de agregados plaquetares. É também essencial o exame do esfregaço quando é verificada anemia, já que a morfologia eritrocitária pode ser indicativa de um determinado diagnóstico. De referir ainda que é indicada a preparação do esfregaço em casos de leucopenia, leucocitose, inversão

da fórmula leucocitária, linfocitose, neutrofilia, eosinofilia, trombocitose, bicitopenia, pancitopenia, alteração dos índices eritrocitários, entre outros. (Bain, 2016)

Apesar do hemograma guiar a observação do esfregaço, é sempre recomendada a avaliação do número e morfologia das três séries celulares, bem como a averiguação da presença de células anormais, tais como células precursoras, e de artefactos.

No laboratório Avelab, os esfregaços são corados manualmente pela coloração de Leishman, uma variação da técnica de Romanowsky. Esta coloração proporciona uma boa diferenciação entre as distintas células sanguíneas. Este contraste é conseguido através do uso de Azure B, um produto da oxidação do azul de metileno, como corante básico e Eosina Y como corante ácido, sendo utilizado metanol como agente fixador. (Sareen *et al.*, 2018)

5. c. Velocidade de sedimentação

A velocidade de sedimentação eritrocitária consiste num teste de rastreio de resposta de fase aguda, cujo valor traduz a velocidade de sedimentação dos eritrócitos no plasma no período de uma hora. Desta forma, é imperativo o uso do sangue total como amostra de eleição. (Silva *et al.*, 2016)

Todavia, este é um teste inespecífico, já que a sedimentação é influenciada pela concentração plasmática de proteínas grandes, como imunoglobulinas e fibrinogénio, e pela presença de anemia. (Bain *et al.*, 2017) A velocidade de sedimentação também tarda a refletir alterações em caso de doença aguda, sendo preferível o doseamento da proteína C reativa para o efeito. Assim, esta análise revela-se mais adequada no diagnóstico e monitorização de doenças crónicas de carácter inflamatório ou neoplásico. (Hoffbrand *et al.*, 2016)

O princípio de medição utilizado baseia-se no método clássico de Westergren, segundo o qual os eritrócitos sedimentam num tubo de Westergren posicionado verticalmente sem perturbações durante uma hora. (Silva *et al.*, 2016) Contudo, o laboratório dispõe do analisador automático Ves-Matic Cube 30 (Diesse Diagnostica Senese, Siena, Itália) que modifica o método clássico de modo a realizar a leitura da sedimentação em 33 minutos, e depois extrapola para uma hora.

5. d. Hemoglobina glicada

A hemoglobina glicada assume-se como um indicador da concentração média de glucose, sendo de grande relevância para a monitorização da diabetes. Oferece uma boa representação da flutuação dos níveis de glucose nos dois a três meses anteriores. (Ding *et al.*, 2018)

Esta determinação utiliza o sangue total como amostra, e o Avelab vale-se do analisador de HPLC Hb NEXT (Menarini Diagnostics, Florença, Itália).

O método de HPLC de troca catiónica (de fase reversa) baseia-se na atração iónica entre a fase estacionária e a molécula de hemoglobina. A adsorção da hemoglobina à coluna conforme o pH e a carga iónica do eluente permite a separação das hemoglobinas com diferentes cargas. À saída da coluna, as diferentes frações de hemoglobina são detetadas, e depois identificadas com base no tempo de retenção. A concentração de Hb A1c (hemoglobina glicada) é calculada através da área do pico correspondente. (Bain *et al.*, 2017)

5. e. Estudo das hemoglobinas

O estudo das hemoglobinas permite a investigação de hemoglobinopatias através da identificação de variantes estruturais ou talassémias potencialmente presentes. Esta análise de rastreio de hemoglobinopatias viabiliza um aconselhamento genético mais adequado aos portadores, e um tratamento mais eficaz dos indivíduos afetados. (Silva *et al.*, 2016)

À semelhança da hemoglobina glicada, este teste emprega o sangue total como amostra, e é levado a cabo no mesmo analisador Hb NEXT (Menarini Diagnostics), recorrendo ao mesmo princípio de HPLC de troca catiónica (de fase reversa). São determinadas as percentagens das hemoglobinas HbF e HbA₂, e são identificadas as variantes HbE, HbD, HbS e HbC.

5. f. Hemostase

Os mecanismos de regulação da hemostase são responsáveis por impedir a perda de sangue aquando de lesão vascular, evitando hemorragias. Contudo, são também responsáveis por manter o sangue fluído nos vasos sanguíneos, evitando trombozes. Na fisiologia normal, este equilíbrio delicado é assegurado por ação do endotélio, das plaquetas e dos fatores de coagulação. (Bain *et al.*, 2017)

O estudo da coagulação centra-se no doseamento dos fatores de coagulação. De uma forma geral, a via intrínseca da ativação da coagulação é avaliada pelo tempo de tromboplastina parcialmente ativada, enquanto a via extrínseca é avaliada pelo tempo de protrombina. (Bain *et al.*, 2017)

5. f. i. Testes de screening da coagulação

O analisador STA Compact Max[®] 2 (Diagnostica Stago S.A.S., Asnières-sur-Seine, França) permite o controlo de patologias da hemostase, seguindo dois princípios de medição distintos: a cronometria e a fotometria. (Brulé *et al.*, 2018)

Para os testes da coagulação, é usado como amostra plasma obtido a partir de sangue centrifugado colhido num tubo de citrato de sódio, sendo a razão de 1:9 entre o anticoagulante e a amostra crítica para a obtenção de resultados fidedignos. O citrato impede o cálcio presente na amostra de desencadear o processo de coagulação. (Silva *et al.*, 2016)

I. Tempo de Protrombina

Como já foi referido, o tempo de protrombina (TP) avalia a via extrínseca da coagulação, permitindo a deteção de deficiências dos seguintes fatores: VII, X, V, protrombina e fibrinogénio. (Hoffbrand *et al.*, 2016)

Para a determinação do TP, é adicionada ao plasma tromboplastina (fonte de fator tecidual) que irá ativar a cascata da coagulação. É também adicionado à amostra cálcio que neutraliza o efeito anticoagulante do citrato. (Hoffbrand *et al.*, 2016)

Este teste é realizado segundo a medição por cronometria. Este método tem por princípio a deteção da formação de coágulos baseada na viscosidade. O método utiliza uma esfera que se movimenta graças à ação de dois eletroímãs ativados alternadamente, originando uma oscilação natural dependente da viscosidade da amostra. É medida a amplitude do movimento da esfera, sendo que esta diminui progressivamente com a crescente coagulação do plasma. Desta forma, é cronometrado o tempo até se formar o coágulo, e são aplicadas fórmulas de cálculo que produzem o resultado final. Através desta técnica mecânica, interferências comuns como amostras hemolisadas, lipémicas ou ictéricas não representam uma fonte de erro. (Brulé *et al.*, 2018)

Por uma questão de padronização, o TP é convertido em razão internacional normalizada (INR) calculada a partir do TP do doente e de um TP normal, e posteriormente corrigido pelo índice de sensibilidade internacional. (Hoffbrand *et al.*, 2016)

O INR figura como o principal parâmetro para controlar o efeito de anticoagulantes orais. O laboratório Avelab tem disponível o serviço de monitorização de doentes hipocoagulados, ou seja, utentes que tomam anticoagulantes orais. Para tal, o laboratório faz a medição do INR, e ajusta o esquema terapêutico dos utentes conforme o necessário.

2. Tempo de Tromboplastina Parcialmente ativada

O tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPa) avalia a via intrínseca da coagulação, pretendendo averiguar possíveis deficiências dos seguintes fatores: XII, XI, IX, VIII, X, V, protrombina e fibrinogénio. (Hoffbrand *et al.*, 2016)

Para ativar a coagulação na amostra de plasma, é-lhe adicionado caulino (ativador de superfície) e cefalina (fosfolípido). Procede-se do mesmo modo à adição do cálcio, e a medição do tempo de coagulação é também realizada segundo o método mecânico de cronometria. (Hoffbrand *et al.*, 2016)

3. Fibrinogénio

A quantificação de fibrinogénio realizada no laboratório também segue o princípio mecânico de cronometria do analisador. Este teste apenas possibilita investigar uma possível deficiência de fibrinogénio. (Hoffbrand *et al.*, 2016)

5. f. ii. D-dímeros

Para a quantificação de d-dímeros, o analisador STA Compact Max[®] 2 (Diagnostica Stago S.A.S.) opera segundo a medição por fotometria. Esta técnica imunoturbidimétrica baseia-se na absorção de luz monocromática que atravessa a cuvete onde tem lugar uma reação imunológica. (Brulé *et al.*, 2018)

Durante a fibrinólise, o coágulo de fibrina é clivado, resultando em vários produtos de degradação, um dos quais são os d-dímeros. Assim, os d-dímeros são resultantes exclusivamente da degradação de fibrina, não sendo encontrados em fibrinogénio ou nos produtos de degradação deste. Por este motivo, o imunoensaio para o doseamento de d-dímeros é específico para a fibrina. Níveis de d-dímeros elevados estão frequentemente associados a eventos tromboembólicos. (Hoffbrand *et al.*, 2019)

5. f. iii. Pesquisa de crioaglutininas

A pesquisa de crioaglutininas é usada como teste de diagnóstico de anemias hemolíticas autoimunes, que podem ser primárias ou secundárias. Em concreto, a anemia hemolítica por anticorpos frios consiste na produção de autoanticorpos, geralmente, da classe IgM, contra os próprios eritrócitos, podendo originar hemólise intravascular de maior ou menor extensão. (Hoffbrand *et al.*, 2019)

Uma vez que os autoanticorpos reagem mais fortemente com os eritrócitos à temperatura de 4°C, os sintomas manifestam-se nos meses mais frios, e, conseqüentemente, este teste laboratorial é realizado com maior frequência no inverno. (Hoffbrand *et al.*, 2019)

Para a pesquisa de crioaglutininas, é utilizado como amostra soro colhido num tubo com ativador de coágulo. Podem-se usar os eritrócitos do utente ou eritrócitos 0 Rh+ para a pesquisa de aglutinação. É realizada a incubação de várias diluições do soro em 3 meios: meio

salino a 4°C; meio salino a 37°C; e meio salino com albumina, que é um potenciador da aglutinação, a 37°C. Posteriormente, é pesquisada a aglutinação das células ao microscópio ótico.

Em paralelo, é também realizado um teste de Coombs indireto para auxiliar o diagnóstico.

5. g. Imunohematologia

5. g. i. Determinação do grupo sanguíneo

A determinação do grupo sanguíneo, principalmente, dos sistemas AB0 e Rh, é clinicamente relevante em situações de transfusão e de gravidez, de forma a prevenir a rejeição do tecido e a doença hemolítica do recém-nascido, respetivamente. Os anticorpos anti-A e anti-B estão naturalmente presentes no plasma de indivíduos que não possuem o antígeno correspondente. No entanto, os anticorpos anti-D apenas são produzidos nos indivíduos Rh negativo após exposição ao antígeno D, normalmente, através de transfusão ou gravidez. (Hoffbrand *et al.*, 2016)

No laboratório, são usadas *cards* Anti-A/Anti-B/Anti-D Ortho BioVue® System (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, E.U.A.) que se baseiam no método de aglutinação em coluna com microesferas de vidro. As *cards* recorrem ao princípio da prova globular, isto é, pesquisam os antígenos A, B e D à superfície dos eritrócitos do utente através do uso de soros anti-A, anti-B e anti-D. Assim, a amostra utilizada é uma suspensão de eritrócitos a 3% em soro fisiológico, obtida após centrifugação do sangue colhido num tubo de EDTA.

Todas as amostras Rh negativas são confirmadas utilizando Blood Grouping Reagent Anti-D BioClone® (Ortho Clinical Diagnostics). A confirmação realiza-se por meio da pesquisa de aglutinação após a adição do soro anti-D e de eritrócitos do utente num poço de uma *card* Anti-IgG, -C3d; polyspecific.

5. g. ii. Teste de Coombs direto

O teste de Coombs direto, também designado teste da antiglobulina direto, é realizado na investigação da doença hemolítica do recém-nascido, da anemia hemolítica autoimune e de hemólise após transfusão incompatível. Este exame visa a deteção de sensibilização de eritrócitos que tenha ocorrido *in vivo*. (Hoffbrand *et al.*, 2016) Assim, são utilizadas como amostra as células do utente obtidas a partir de sangue centrifugado colhido em tubo de EDTA.

O Avelab dispõe das *cards* Anti-IgG, -C3d; polyspecific Ortho BioVue® System (Ortho Clinical Diagnostics) para a execução deste teste. Este *kit* segue o mesmo método de aglutinação em coluna com microesferas de vidro. Os eritrócitos do utente são adicionados aos poços que contêm antiglobulina humana, e após a centrifugação das *cards* os aglutinados são separados. As células não sensibilizadas conseguem atravessar a matriz de microesferas, enquanto que os aglutinados se acumulam no topo da matriz. Quando se observa aglutinação, trata-se de um teste positivo. (Bain *et al.*, 2017)

5. g. iii. Teste de Coombs indireto

O teste de Coombs indireto, ou teste da antiglobulina indireto, pesquisa anticorpos que se liguem a eritrócitos. Ao contrário do teste direto, a ligação dá-se *in vitro*, utilizando para o efeito eritrócitos 0 Rh+ e o plasma do utente obtido através da centrifugação de sangue colhido em tubo de EDTA. Este teste é fundamental, e principalmente utilizado na deteção de anticorpos anti-D em grávidas Rh-. (Hoffbrand *et al.*, 2016)

Para a concretização desta análise, o laboratório utiliza as *cards* Anti-IgG, -C3d; polyspecific Ortho BioVue® System (Ortho Clinical Diagnostics) já referidas, seguindo o mesmo princípio de aglutinação em coluna. São usadas também as células do kit Selectogen 0,8% (Ortho Clinical Diagnostics).

6. Microbiologia

A Microbiologia exerce um papel fundamental no diagnóstico de doenças infecciosas e também no seu tratamento. A sua relevância clínica centra-se na identificação do agente patogénico responsável pela infeção e na respetiva determinação da suscetibilidade aos antibióticos disponíveis.

Para a correta caracterização do microrganismo causador de infeção, é necessário o conhecimento da microbiota comensal própria de cada amostra biológica e dos principais agentes patogénicos e contaminantes que lhe estão associados. Desta forma, é possível a distinção entre colonização e infeção.

Os diferentes produtos biológicos são processados de acordo com o respetivo protocolo laboratorial. De um modo geral, procede-se primeiramente à sementeira nos meios de cultura apropriados, e depois ao exame direto, à identificação do agente etiológico e ao antibiograma. Estes dois últimos testes são, muitas vezes, realizados de forma automatizada no VITEK[®] 2 Compact (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, França). Efetuam-se ainda testes de biologia molecular que recorrem aos equipamentos adequados para o efeito. Contudo, a execução dos restantes exames microbiológicos é feita manualmente, sendo esta a área laboratorial menos automatizada.

6. a. Urina

Trata-se do produto biológico mais recorrente no setor da Microbiologia, sendo o exame bacteriológico de urina o teste mais pedido nesta área.

A amostra de urina utilizada é o jacto médio de urina, colhido para um frasco estéril após a higienização genital com água e sabão. Quando necessário também se pode realizar a colheita por punção de catéter urinário, por punção supra-púbica, ou por saco coletor em crianças. (Fonseca *et al.*, 2004) Há a preferência pela primeira urina da manhã, uma vez que esta apresentará uma maior concentração de microrganismos. (Murray *et al.*, 2007)

Apesar do trato urinário acima da uretra ser estéril em indivíduos saudáveis, a uretra mais distal apresenta frequentemente uma microbiota comensal oriunda do períneo, principalmente, nas mulheres. Estes contaminantes devem ser diferenciados de possíveis patogéneos. Daí, a importância da colheita do jato médio para uma amostra representativa, já que o primeiro jato de urina arrasta os contaminantes, eliminando-os. (Mahon *et al.*, 2015)

As infeções do trato urinário (ITU) compreendem pielonefrites, cistites, uretites, vaginites e prostatites. O agente patogénico responsável mais comum é *Escherichia coli*, representando cerca de 70% das ITU. Entre os outros agentes etiológicos mais frequentes figuram *Staphylococcus saprophyticus*, e outras enterobactérias, para além de *E. coli*, como *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Proteus*. (Flores-Mireles *et al.*, 2015)

A urocultura engloba a quantificação, identificação e TSA dos microrganismos presentes na urina por exame cultural, bem como a análise sumária de urina. Esta última facultar-nos informação sobre determinados parâmetros bioquímicos e físicos, e é acompanhada do exame microscópico do sedimento urinário.

6. a. i. Análise sumária de urina

No Avelab, a sumária de urina realiza-se quando requisitada pelo clínico, e é executada pelo autoanalisador químico de urina Unamax[®] (Menarini Diagnostics). O equipamento recorre a tiras reagente para a determinação dos seguintes parâmetros químicos por fotometria de refletância: nitritos, esterase leucocitária, cetonas, urobilinogénio, bilirrubina, glucose, proteínas, pH e hemoglobina. A urina reage com os reagentes presentes na tira, originando mudanças de cor que são detetadas por refletância. No que toca aos parâmetros físicos, este equipamento determina a cor da urina por transmitância, a turvação por dispersão de luz e densidade por índice de refração.

Para o rastreio de urinas suspeitas de ITU, os parâmetros mais valorizados da sumária são a esterase leucocitária, a hemoglobina e os nitritos.

6. a. ii. Sedimento urinário

O sedimento urinário é executado para a avaliação citológica da urina em todas as amostras indicadas para exame bacteriológico de urina.

A execução manual do sedimento urinário consiste na centrifugação de 10 mL de urina a 2000 rpm por 10 minutos seguida da rejeição de cerca de 9 mL do sobrenadante obtido. Posteriormente, o sedimento é observado ao microscópio ótico entre lâmina e lamela, procedendo-se à identificação e contagem dos elementos presentes na urina, como leucócitos, eritrócitos, bactérias, fungos, células epiteliais, cristais, entre outros.

Em contexto de ITU, os achados mais pertinentes no exame do sedimento são os que indicam a presença de infeção franca, nomeadamente, leucócitos (piúria), bactérias e também

fungos. Para a averiguação do tipo de morfologia da flora observada, procede-se à visualização da coloração de Gram do sedimento. (Tille, 2017)

6. a. iii. Exame cultural

O meio de cultura de eleição para a quantificação e isolamento de uropatógenos é o meio CHROMagar Orientation. Este destaca-se como um meio não seletivo pela ausência de agentes inibidores do crescimento, e diferencial pelo uso de substratos cromogénicos que permitem a identificação direta ou presuntiva dos principais agentes responsáveis pelas ITU. As colónias de *E. coli* apresentam cor rosa devido à produção de β -glucuronidase e/ou β -galactosidase, podendo a bactéria ser identificada diretamente. As bactérias dos géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* e *Enterococcus* produzem β -glucosidase, e surgem como colónias azuis, contudo o género *Enterococcus* origina colónias comparativamente mais pequenas. Graças à produção de desaminase, os géneros *Proteus*, *Providencia* e *Morganella* geram colónias castanhas. (Perry, 2017) As uroculturas com alguns dos agentes patogénicos mais comuns estão ilustradas na Figura 1.

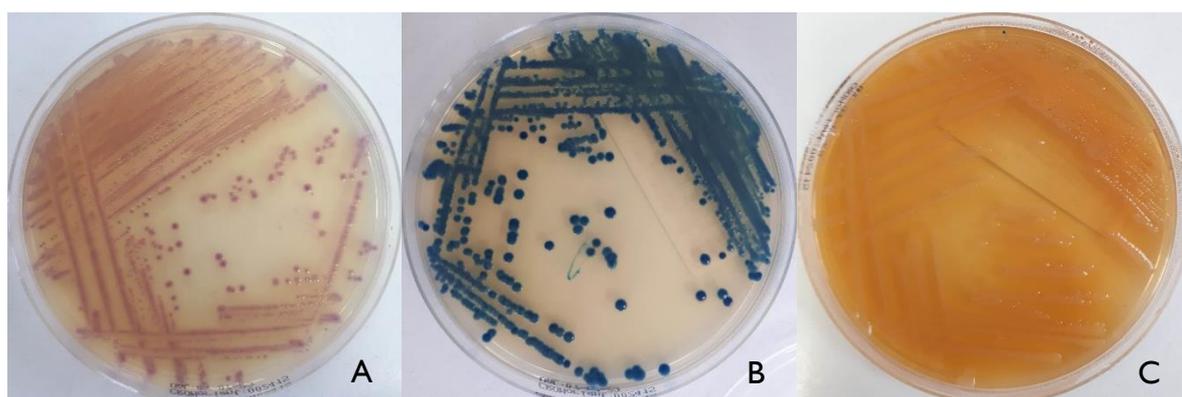


Figura 1: Exemplos de uroculturas em CHROMagar Orientation de *E. coli* (A), *Klebsiella pneumoniae* (B) e *Proteus mirabilis* (C). (Fotos tiradas no laboratório)

Quando o sedimento urinário ou o Gram, realizados anteriormente, sugerem a presença de cocos de Gram positivo, é realizada em paralelo a sementeira em gelose de sangue para o melhor crescimento e isolamento destes microrganismos. (Perry, 2017)

Adicionalmente, se solicitado pelo clínico ou se o sedimento evidenciar a presença de leveduras, é também realizada a sementeira em gelose de Sabouraud.

Após a homogeneização da urina no frasco de colheita, inocula-se o meio com uma ansa calibrada de 1 μ L. Os meios semeados são incubados na estufa a 37 °C em aerobiose durante 18-24 horas, sendo o meio de Sabouraud incubado até às 48 horas.

A quantificação de microrganismos é realizada em UFC/mL, isto é, unidades formadoras de colónias por mililitro de urina. O exame bacteriológico de urina é considerado positivo se a cultura apresentar o crescimento de um ou dois tipos de colónias numa contagem superior a 10^4 UFC/mL, acompanhado da presença de leucócitos no sedimento e de raras células epiteliais. Quando se verifica polimorfismo bacteriano, ou seja, o crescimento de três ou mais tipos de colónias, associado à existência de numerosas células epiteliais, isto é indicativo de uma urina contaminada possivelmente por má colheita. Neste caso, o resultado é dado como cultura polimicrobiana, e aconselha-se a repetição da colheita com as devidas condições de assepsia.

Por último, procede-se à identificação e ao antibiograma das uroculturas positivas no VITEK[®] 2 Compact (bioMérieux). Porém, as culturas de *E. coli* apenas realizam o antibiograma.

6. b. Fezes

As infeções gastrointestinais são geralmente adquiridas por ingestão de bactérias, toxinas ou vírus através de água ou alimentos contaminados. A determinação do agente etiológico destas infeções, frequentemente causadoras de diarreia, é realizada nas fezes.

Para o exame bacteriológico, a colheita de apenas uma amostra de fezes diarreicas é suficiente em casos agudos. Já para a deteção de parasitas, aconselha-se a colheita de três amostras de fezes em dias alternados até um máximo de dez dias. (Fonseca *et al.*, 2004)

O cólon encontra-se fortemente colonizado por bactérias anaeróbias obrigatórias e facultativas, bem como por leveduras. Deste modo, é comum uma flora comensal constituída por enterobactérias, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. (Mahon *et al.*, 2015) Assim, as bactérias patogénicas gastrointestinais isoladas mais amiúde são *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* e *Campylobacter spp.*, nomeadamente, *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*. (Sell *et al.*, 2018)

6. b. i. Exame bacteriológico das fezes

Numa primeira instância, é avaliado o aspeto macroscópico da amostra de fezes quanto à sua consistência, cor, odor e presença de muco ou sangue. De seguida, procede-se à coprocultura e ao exame direto de uma suspensão de fezes em soro fisiológico entre lâmina e lamela. Este exame a fresco tem o intuito de averiguar a presença de leucócitos e eritrócitos, sendo também relatada a observação de outras estruturas como parasitas ou leveduras. A partir da lâmina usada para o exame a fresco é realizada uma coloração de Gram. No Gram direto, avalia-se a predominância de alguma morfologia bacteriana que sugira um desequilíbrio da flora, e é ainda referida a presença de leveduras.

Na coprocultura por norma realiza-se a pesquisa de *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Campylobacter* spp. através da inoculação de meios de cultura seletivos e diferenciais. Para o efeito, são utilizados os seguintes meios: Salmonella-Shigella (SS), Campyloset, caldo de selenito cisteína e MacConkey.

O meio SS é um meio seletivo para *Salmonella* spp. e *Shigella* spp., uma vez que contém sais biliares, citrato de sódio e verde brilhante que inibem o crescimento de cocos de Gram positivo e de vários bacilos de Gram negativo fermentadores da lactose. Trata-se também de um meio diferencial pois as bactérias fermentadoras de lactose produzem colónias avermelhadas, enquanto que as restantes dão origem a colónias incolores. A diferenciação é conseguida também pela presença de tiosulfato de sódio e de citrato férrico amoniacal, que permitem identificar as colónias produtoras de H₂S já que estas apresentam um centro negro. As colónias incolores com um centro negro são indicativas de *Salmonella* spp.. (S.S., 2014) Após inoculação, os meios SS são incubados em aerobiose a 37 °C por 18-24 horas até um máximo de 48 horas.

O meio enriquecido Campyloset possibilita o isolamento seletivo de *Campylobacter* spp. através do uso de antibióticos. As colónias características de *Campylobacter* geralmente são cinzentas e podem apresentar um aspeto mucóide. (Mahon et al., 2015) Os meios são semeados e incubados a 37 °C por 18-24 horas até 72 horas, numa atmosfera microaerofílica constituída por 5% oxigénio, 10% dióxido de carbono e 85% nitrogénio. (Murray et al., 2007) A condição de microaerobiose obtém-se por meio do uso de sacos geradores CampyGen (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, E.U.A.).

Em paralelo é também inoculado caldo de selenito cisteína que permite a melhor recuperação de *Salmonella* em amostras que apresentem uma flora microbiana muito variada. O caldo de enriquecimento é seletivo para *Salmonella* spp. e algumas espécies de *Shigella*, inibindo o crescimento da microbiota associada. (Mahon et al., 2015) Após incubação do caldo em aerobiose a 37 °C durante 18-24 horas, este é repicado para o meio SS.

A gelose de MacConkey é um meio seletivo para o isolamento de bacilos de Gram negativo pela presença de sais biliares e cristal violeta. Permite diferenciar os fermentadores de lactose, que originam colónias rosa, dos não fermentadores. (Mahon et al., 2015) Após a inoculação, os meios são incubados em aerobiose a 37 °C por 18-24 horas até 48 horas.

A identificação presuntiva das colónias suspeitas de *Salmonella* spp. é feita pelo teste rápido de aglutinação em látex Oxoid™ Salmonella Test Kit (Thermo Fisher Scientific™). As

partículas de látex estão revestidas com anticorpos contra antígenos flagelares de *Salmonella*. Na presença destes antígenos, isto é, numa amostra positiva para *Salmonella* spp., as partículas aglutinam-se, sendo visível aglutinação macroscópica. (Oxoid, 2016)

6. b. ii. Exame micológico das fezes

Para a pesquisa de fungos, nomeadamente, de *Candida* spp., as fezes são semeadas em meio de Sabouraud. Este é incubado a 37 °C em aerobiose durante 2-3 dias. As colónias características de *Candida* spp. apresentam um aspeto esbranquiçado, e são repicadas para o meio seletivo para *Candida*, CandiSelect.

6. b. iii. Exame parasitológico das fezes

Entre os principais parasitas intestinais causadores de diarreia encontram-se os protozoários *Giardia* spp., *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica*, *Blas-tocystis hominis*, e os helmintas *Trichuris trichiura* e *Strongyloides stercoralis*. (Murray et al., 2016)

Em primeiro lugar, realiza-se o exame macroscópico das fezes para a deteção de estruturas parasitárias macroscópicas.

No Avelab, são utilizados os concentradores de parasitas fecais Mini Parasep® SF (Apacor™, Wokingham, Reino Unido) para a execução do exame parasitológico. Este kit permite a separação de resíduos fecais, e apresenta uma elevada sensibilidade através da concentração de ovos e larvas de helmintas e de quistos e ooquistos de protozoários. Trata-se, portanto, de um exame após concentração por um método de sedimentação para a deteção microscópica de parasitas mais eficaz. (Mewara et al., 2019)

Idealmente, são processadas três amostras de fezes para este teste. À câmara de mistura dos tubos Mini Parasep® SF (Apacor™) é adicionada uma pequena porção de fezes. Após emulsificação, inversão e centrifugação dos tubos, decanta-se o sobrenadante. O sedimento obtido é observado ao microscópio ótico entre lâmina e lamela. Com a objetiva de 10x pesquisam-se ovos e larvas, e com a objetiva de 40x pesquisam-se quistos. Deve-se percorrer toda a lamela com ambas as ampliações, sendo a observação de apenas uma estrutura parasitária suficiente para o diagnóstico definitivo da parasitose em questão. (Kopolrat et al., 2022)

6. b. iv. Pesquisa de antígeno de *Helicobacter pylori*

A bactéria *H. pylori* está associada a várias patologias a nível gástrico e duodenal, tais como a gastrite e a úlcera péptica. A pesquisa deste agente etiológico em lesões gastrointestinais pode ser realizada por um teste de antígeno numa amostra de fezes. (Murray et al., 2007)

Desta forma, para auxiliar o diagnóstico de infecção por *H. pylori* é utilizado o imunoensaio NADAL® *H. pylori* Antigen Rapid Test (nal von minden) que permite a detecção do antígeno nas fezes. Trata-se de um teste de *lateral flow assay*. A amostra reage com conjugados anticorpo anti-*H. pylori*-ouro coloidal presentes na área de aplicação da amostra. Durante o teste, estes conjugados migram na membrana da cassete por ação capilar. Se existirem antígenos anti-*H. pylori* na amostra, estes conjugados ligam-se aos anticorpos anti-*H. pylori* imobilizados na membrana na região de teste, formando uma banda visível que indica um resultado positivo. O bom funcionamento do teste é assegurado pelo aparecimento de uma banda na linha de controlo. (Nadal, 2013)

6. b. v. Pesquisa de antígeno de *Giardia*

A infecção por *Giardia lamblia* é a parasitose intestinal mais comum a nível global. Enquanto que a maioria dos infetados são assintomáticos, os indivíduos sintomáticos apresentam doença diarreica que pode evoluir para giardíase crónica caracterizada por diarreia intermitente. (Sell et al., 2018)

A pesquisa direcionada de *Giardia* spp. é feita pelo teste imunocromatográfico *Giardia* Card (Liofilchem®, Roseto degli Abruzzi, Itália). A detecção de antígenos de *Giardia* spp. nas fezes segue o mesmo princípio de *lateral flow assay* do teste rápido para pesquisa de *H. pylori*. Os antígenos presentes na amostra reagem com as partículas revestidas com anticorpos anti-*Giardia*, e o conjugado migra na membrana por ação capilar. Em amostras positivas, este conjugado liga-se aos anticorpos imobilizados na linha de teste. (Giardia, 2015)

6. b. vi. Pesquisa de antígeno de Adenovírus e Rotavírus

Os rotavírus e os adenovírus são responsáveis pela diarreia infecciosa, figurando como os principais agentes de gastroenterite viral em crianças abaixo dos 5 anos. O serogrupo A do rotavírus e os serótipos 40 e 41 do subgrupo F do adenovírus representam a causa da maioria das infeções intestinais víricas. (Kim et al., 2014)

Os testes rápidos utilizados GastroVir K-SeT (Coris BioConcept, Gembloux, Bélgica) possibilitam a detecção do serogrupo e dos serótipos supracitados através da tecnologia de *lateral flow assay*. Desta forma, a pesquisa de rotavírus e de adenovírus realiza-se de maneira análoga aos testes anteriores. Após a adição da amostra à cassete, os conjugados microesferas de látex-anticorpos migram na membrana até à região de teste. Se a amostra for positiva, os conjugados ligados aos antígenos fixam-se aos anticorpos imobilizados, formando uma banda na respetiva linha de teste. (GastroVir, 2023)

6. c. Exsudados vaginais

O processamento destas amostras tem como objetivo a determinação da etiologia de uma variedade de patologias clínicas, tais como, vulvovaginite e vaginose bacteriana. Estas infecções caracterizam-se pela presença de corrimento vaginal e prurido. As infecções mais comuns são vaginose bacteriana, candidíase vulvovaginal e tricomoníase. (Tille, 2017)

Os exsudados vaginais devem ser colhidos da zona mais profunda da vagina possível com zaragatoa de alginato de cálcio e do endocolo, e transportado em meio de transporte apropriado à temperatura ambiente. (Fonseca *et al.*, 2004)

Estas amostras encontram-se contaminadas pela flora comensal da pele e genital, sendo essencial a sua diferenciação de potenciais agentes patogénicos. Esta distinção é feita através da morfologia do agente patogénico, da sua quantidade relativa e da presença de infeção. Assim, é imperativa a coloração de Gram do esfregaço, cuja interpretação irá auxiliar a compreensão dos exames culturais. A deteção de microrganismos como *Neisseria gonorrhoeae* e *Trichomonas vaginalis* é sempre sinónima de infeção, enquanto que a relevância clínica de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* β -hemolíticos e enterobactérias depende da situação clínica. Como parte da microbiota comensal vaginal são esperados bacilos de Döderlein. (Murray *et al.*, 2007)

A vaginose bacteriana e a candidíase vulvovaginal devem-se a desequilíbrios da flora vaginal, nos quais microrganismos integrantes da flora comensal como *Gardnerella vaginalis* e *Candida* spp. têm um crescimento excessivo. A tricomoníase e a gonorreia são infeções sexualmente transmissíveis, podendo a *Trichomonas vaginalis* também ser transmitida por fómite. (Murray *et al.*, 2007)

6. c. i. Exame bacteriológico, micológico e parasitológico

A deteção de *G. vaginalis*, *N. gonorrhoeae*, *Candida* spp., *T. vaginalis*, entre outros agentes patogénicos faz-se através da observação microscópica do exsudado e de exames culturais.

Realiza-se o exame a fresco para avaliação do número de leucócitos presentes na amostra e para a pesquisa de parasitas flagelados, nomeadamente, *Trichomonas vaginalis*. Este parasita é mais facilmente observado pelo seu movimento, devendo a observação do exsudado ser realizada o mais rapidamente possível após a colheita.

De seguida, cora-se a preparação a fresco pela coloração de Gram, cuja observação deverá ser acompanhada pela indicação das morfologias existentes, em especial, de bacilos de

Döderlein ou lactobacilos. Deve também ser evidenciada a presença de cocobacilos de Gram positivo, negativo ou variável consistentes com *Gardnerella vaginalis*, bem como a presença de 'clue cells'. Estas são células epiteliais de descamação às quais estão aderidas *G. vaginalis*, principalmente, na periferia da célula. (Tille, 2017) A observação de diplococos de Gram negativo intra e extracelulares é sugestiva de *Neisseria gonorrhoeae*, devendo a sua presença ser confirmada por exame cultural.

Os exsudados vaginais são semeados em gelose de chocolate, cuja incubação é realizada durante 24-48 horas a 37 °C numa atmosfera de 5% de CO₂ conseguida pelo uso de uma jarra de Gaspak. A gelose de chocolate é usada, pois é um meio enriquecido adequado ao crescimento e isolamento de microrganismos fastidiosos, tendo esta cultura o principal objetivo de confirmar a presença de *N. gonorrhoeae*. (Mahon et al., 2015)

O exame micológico faz-se pela pesquisa de leveduras ou pseudohifas na coloração de Gram. Procede-se também à inoculação de Sabouraud e do meio CandiSelect por 24-48 horas a 37 °C em aerobiose. O crescimento de colónias características neste meio cromogénico CandiSelect permite a identificação direta de *Candida albicans* e a identificação presuntiva de *Candida spp.*

6. c. ii. Pesquisa de *Streptococcus* β-hemolíticos do grupo B

A pesquisa de *Streptococcus* β-hemolíticos do grupo B pretende a prevenção de infeções invasivas do recém-nascido que englobam septicémia, pneumonia e meningite. O fator de risco mais significativo para o desenvolvimento destas complicações é a colonização do trato urogenital ou gastrointestinal materno por *Streptococcus agalactiae*. Esta bactéria também pode causar doença no adulto. (Murray et al., 2007)

Este rastreio é parte integrante da bateria de exames laboratoriais na vigilância da gravidez de baixo risco, devendo ser realizado em todas as grávidas entre as 35 e as 37 semanas de gestação. (Direção-Geral da Saúde, 2013)

A pesquisa é realizada numa zaragatoa vaginal/retal que chega ao laboratório acondicionada em meio de transporte Amies. A amostra é inoculada em caldo de Todd-Hewitt, um meio de enriquecimento para o isolamento de *Streptococcus*, que é incubado durante a noite a 37 °C. O caldo é repicado para o meio cromogénico e seletivo Strepto B, sendo este incubado a 37 °C em condições de aerobiose. Após 24 horas de incubação, averigua-se o crescimento de colónias vermelhas características (Figura 2.B). Caso não sejam observadas (Figura 2.A), a cultura é reincubada mais 24 horas, ao fim das quais é novamente

inspecionada. Para que o rastreio seja positivo, basta a observação de apenas uma colónia vermelha na placa.

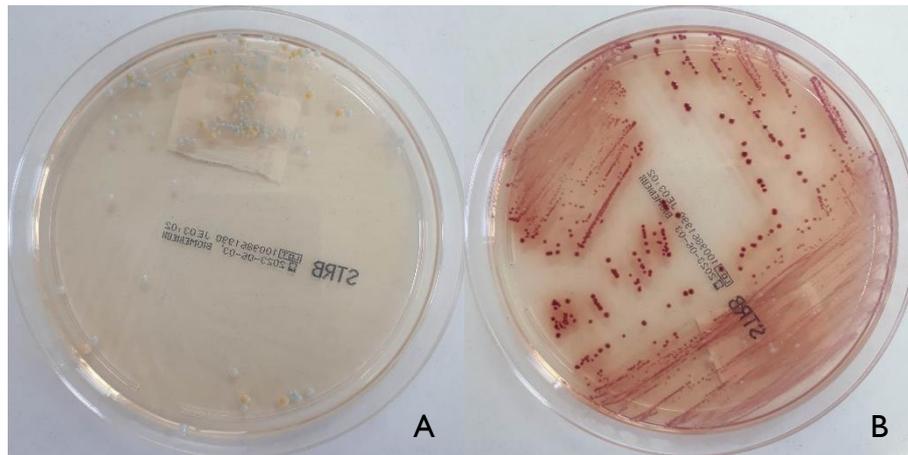


Figura 2: Exemplos de pesquisa de *Streptococcus* β -hemolíticos do grupo B negativa (A) e positiva (B). (Fotos tiradas no laboratório)

6. c. iii. Painel molecular de ISTs

Quando pedido, a detecção de infecção pelos seguintes microrganismos sexualmente transmissíveis pode ser realizada por método molecular com amplificação: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* e *Ureaplasma urealyticum*. A análise é possível com amostras de exsudados vaginais, uretrais ou urina.

Para a extração automatizada dos ácidos nucleicos, utiliza-se o kit de extração GXT NA (Hain Lifescience GmbH) e o extrator GenoXtract[®] (Hain Lifescience GmbH). A extração é conseguida pelo uso de partículas magnéticas. Após a lise membranar, as partículas são adicionadas à amostra, ligando-se aos ácidos nucleicos, os quais são separados do sobrenadante por separação magnética. Por último, após sucessivas lavagens e adição do tampão de eluição, os ácidos nucleicos desassociam-se das partículas magnéticas, e é obtido o eluado. (Klein et al., 2020)

A amplificação e detecção dos ácidos nucleicos é efetuada no termociclador FluoroCycler[®] XT (Hain Lifescience GmbH), sendo utilizado o kit de amplificação FluoroType[®] STI (Hain Lifescience GmbH). Trata-se de um painel multiplex com amplificação por PCR. Os sete microrganismos são detetados pelo uso de nove alvos, estando alocados à *Chlamydia trachomatis* e à *Neisseria gonorrhoeae* dois alvos cada. Para a amplificação do produto de interesse realizam-se ciclos sucessivos de desnaturação por calor, *annealing* dos diversos *primers* aos diferentes alvos, e extensão pela polimerase.

6. d. Exsudados uretrais

A análise microbiológica de exsudados uretrais permitem determinar o agente causador de uretrites, principalmente, no homem. Estas infeções são, muitas vezes, causadas por microrganismos transmitidos sexualmente como *Trichomonas vaginalis* e *Neisseria gonorrhoeae*.

A colheita é realizada antes da micção e após esterilização da mucosa circundante, seguida da introdução da zaragatoa na uretra cerca de 2 cm para recolher o exsudado. A zaragatoa deverá ser enviada para o laboratório em meio de transporte apropriado à temperatura ambiente. (Fonseca *et al.*, 2004)

O exame bacteriológico, micológico e parasitológico destas amostras contempla o exame direto e o cultural. Na observação direta a fresco, avalia-se a quantidade de células epiteliais, leucócitos e eritrócitos, bem como a presença de parasitas flagelados como *T. vaginalis*. A pesquisa de leveduras e de diplococos de Gram negativo sugestivos de *N. gonorrhoeae* é feita pela coloração de Gram do esfregaço. O exame cultural recorre à inoculação da gelose de Sabouraud e da gelose de chocolate para a deteção do crescimento de fungos leveduriformes (*Candida* spp.) e de *N. gonorrhoeae*, respetivamente. A gelose de Sabouraud é incubada por 24-48 horas a 37 °C em aerobiose, podendo-se fazer a repicagem de colónias características de *Candida* spp. para o meio CandiSelect. A incubação da gelose de chocolate é realizada a 37 °C durante 24-48 horas numa atmosfera de 5% de CO₂.

6. e. Secreções respiratórias

O trato respiratório pode ser afetado por diversas infeções bacterianas e víricas, entre elas, faringites, gripes, bronquites e pneumonia. Enquanto que o trato respiratório superior apresenta uma microbiota comensal na qual predominam *Streptococcus* do grupo viridans, difteróides e *Staphylococcus* spp., o trato respiratório inferior é normalmente estéril. (Mahon *et al.*, 2015)

Entre os principais agentes patogénicos primários do trato respiratório encontram-se *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* β-hemolíticos do grupo A, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Mycobacterium tuberculosis*. Existem ainda possíveis patogéneos dos quais constam: *Acinetobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae*. (Mahon *et al.*, 2015)

Dada a existência destes agentes cuja patogenicidade depende da situação clínica do indivíduo, é fundamental a distinção entre colonização e infeção. Para isso, são tidos em conta

fatores como a presença de leucócitos e o número de microrganismos na amostra. Sempre que a informação esteja disponível, deve-se também considerar a presença de um quadro clínico compatível. (Mahon *et al.*, 2015)

6. e. i. Exsudados nasais

A colheita do exsudado nasal deverá ser realizada através da inserção da zaragatoa estéril em cada narina, rodando a mesma contra a mucosa nasal, procedendo-se ao seu envio em meio de transporte apropriado para o laboratório. (Fonseca *et al.*, 2004)

1. Pesquisa de *Staphylococcus aureus*

A bactéria oportunista *Staphylococcus aureus* coloniza as fossas nasais de cerca de 30% dos indivíduos saudáveis. (Tille, 2017) A toxina produzida pelo *S. aureus* é uma das causas mais comuns de intoxicação alimentar. A contaminação dos alimentos é feita pelos manipuladores colonizados na nasofaringe e pelos manipuladores com infecções cutâneas por *S. aureus*. Por forma a controlar possíveis surtos, são realizados rastreios nos manipuladores de alimentos para a identificação de portadores assintomáticos. (Murray *et al.*, 2016)

Para o estudo da colonização nestes profissionais, inocula-se o exsudado nasal em gelose de Chapman. Trata-se de um meio seletivo para o crescimento de estafilococos, que permite a identificação de *S. aureus* pela fermentação do manitol. A placa é incubada por 24-48 horas em aerobiose a 37 °C, e o crescimento de apenas uma colónia amarela característica de *S. aureus* garante a positividade do exame. A identificação de *S. aureus* é confirmada pelo teste de coagulase, discutido mais à frente.

2. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA)

Inicialmente, a infeção por MRSA era considerada nosocomial. Contudo, esta noção tem-se vindo a alterar com a observação de casos de infeção por MRSA adquiridas na comunidade. (Boswihi *et al.*, 2018) A emergência destas infeções torna mais importante as medidas de prevenção e controlo da colonização e infeção implementadas pela DGS. O rastreio de portadores de MRSA deve ser realizado aos doentes que apresentem risco acrescido de colonização ou infeção, e que se encontrem internados em hospitais ou unidades de saúde. (Direção-Geral de Saúde, 2014)

Para a pesquisa de MRSA por exame cultural, inocula-se a zaragatoa nasal no meio cromogénico MRSA SMART que permite a identificação direta de MRSA. O meio é incubado em aerobiose durante 18-24 horas a 37 °C, sendo a visualização de pelo menos uma colónia

avermelhada indicativa de um resultado positivo. À semelhança do teste anterior, a confirmação da espécie é realizada pelo teste da coagulase.

Quando requisitada esta pesquisa pode também ser executada por PCR em tempo real. Recorre-se ao kit SpheroLyse (Hain Lifescience GmbH) para a extração manual do DNA bacteriano, e ao termociclador FluoroCycler® XT (Hain Lifescience GmbH). O kit de amplificação FluoroType® MRSA (Hain Lifescience GmbH) efetua a deteção simultânea da cassete cromossómica estafilocócica (SCC*mec*) e dos genes homólogos *mecA* e *mecC* que conferem resistência à meticilina. Para que a pesquisa de MRSA seja considerada positiva é necessária a deteção de SCC*mec* e de *mecA/mecC*.

6. e. ii. Pesquisa molecular de SARS-CoV-2

A pesquisa de SARS-CoV-2 executa-se no exsudado nasofaríngeo, cuja colheita é feita pela introdução cuidadosa de uma zaragatoa flexível através do nariz até à nasofaringe em movimento de rotação. A zaragatoa deverá chegar ao laboratório em meio de transporte apropriado. (Fonseca *et al.*, 2004)

A deteção de SARS-CoV-2 realiza-se por PCR-RT em tempo real. A extração dos ácidos nucleicos é realizada com o kit Nucleic Acid Extraction and Purification (Jiangsu Biopurfectus Technologies®, Taizhou, China) pelo método de partículas magnéticas no extrator SSNP-2000B (Jiangsu Biopurfectus Technologies®). À semelhança dos restantes testes moleculares, a amplificação e deteção dos ácidos nucleicos é realizada no termociclador FluoroCycler® XT (Hain Lifescience GmbH), sendo utilizado o kit de amplificação FluoroType® SARS-CoV-2 plus (Hain Lifescience GmbH). Este teste tem como alvo dois genes independentes do vírus, o gene RdRp (RNA dependente RNA polimerase) e o gene N (nucleocápside). A partir do mRNA viral, a ação da transcriptase reversa (RT) permite a formação de cDNA, que será utilizado para os ciclos de amplificação por PCR.

6. e. iii. Exsudados orofaríngeos

O exsudado orofaríngeo deverá ser representativo da orofaringe, das amígdalas e de qualquer área inflamada ou ulcerada com exceção da epiglote. A colheita é feita com uma zaragatoa entre os pilares e por trás da úvula, evitando tocar na mucosa bucal e na língua. A zaragatoa deverá ser acomodada em meio de transporte adequado. (Fonseca *et al.*, 2004)

O processamento do exsudado orofaríngeo é principalmente direcionado para a pesquisa de *Streptococcus* β -hemolíticos do grupo A, isto é, *Streptococcus pyogenes*, responsável

por faringite e escarlatina. Esta pesquisa pode ser realizada por exame cultural ou por teste rápido conforme a requisição.

1. Exame bacteriológico

Para a pesquisa de *Streptococcus* β -hemolíticos do grupo A por exame cultural, recorre-se apenas à inoculação da zaragatoa em gelose de sangue. Após incubação a 37 °C durante 24-48 horas em atmosfera de 5% de CO₂, averigua-se o crescimento de colónias hemolíticas características no meio.

2. Pesquisa de antígeno de *Streptococcus* β -hemolíticos do grupo A

A pesquisa direcionada de *Streptococcus* β -hemolíticos do grupo A é realizada pelo teste de *lateral flow assay* Strep A Antigen Rapid Detection Kit (Healgen Scientific®, Houston, E.U.A.). O princípio do teste é semelhante aos dos testes rápidos já descritos, recorrendo a partículas de ouro para a deteção de antígenos na amostra.

6. e. iv. Expectoração

Para a obtenção de uma boa amostra de expectoração, aconselha-se a colheita da amostra em jejum. Após lavagem da boca e gargarejo com água, deve-se colher expectoração por tosse profunda para um recipiente esterilizado, de boca larga e encerramento hermético. (Fonseca *et al.*, 2004)

A avaliação da qualidade da amostra é de extrema relevância para determinar se estamos perante uma amostra de expectoração representativa do local de infeção ativa, ou se se trata de uma amostra de saliva que apresenta contaminação pela microbiota oral. Características macroscópicas como presença de pus ou de sangue são indicadores da boa qualidade da amostra, enquanto que um aspeto meramente mucóide indica que se trata de saliva. A observação de mais de 25 leucócitos e menos de 10 células epiteliais por campo na ampliação de 100x, bem como a presença de monomorfismo ou predomínio bacteriano indicam boa qualidade da amostra. (Ho *et al.*, 2015)

O exame direto e cultural da expectoração consiste na pesquisa de bactérias e de fungos. Para o efeito, realiza-se a coloração de Gram para averiguação do número de leucócitos e caracterização da flora observada, e a coloração de Ziehl-Neelsen para a pesquisa de bacilos ácido-álcool resistentes. São semeadas as geloses de sangue e de chocolate, e incubadas por 24-48 horas a 37 °C em condições de 5% de CO₂. Se no Gram forem observados cocos de Gram positivo ou bacilos de Gram negativo, procede-se à inoculação de gelose de Chapman

ou gelose de MacConkey, respetivamente, que são incubadas por 24-48 horas a 37 °C em aerobiose. Se forem observadas leveduras ou pseudohifas, realiza-se a inoculação de meio de Sabouraud, sendo este incubado durante 24-72 horas em aerobiose a 37 °C.

I. Pesquisa de micobactérias

A pesquisa de micobactérias pretende o isolamento de micobactérias, nomeadamente, *Mycobacterium tuberculosis* para o diagnóstico de tuberculose. É aconselhado o exame de três amostras de expectoração colhidas em dias consecutivos. (Fonseca *et al.*, 2004) Esta pesquisa pode também ser feita em amostras de urina.

As etapas de descontaminação, fluidificação e concentração têm em vista a obtenção de culturas puras através da digestão do material proteico presente na amostra, da potenciação da recuperação de micobactérias e da inibição do crescimento de contaminantes. (Mahon *et al.*, 2015)

O exame direto ou baciloscopia é realizado pela coloração de Ziehl-Neelsen para a quantificação de bacilos ácido-álcool resistentes, podendo este exame ser executado a partir da suspensão resultante da descontaminação, fluidificação e concentração, ou diretamente a partir da amostra. Para o exame cultural, semeia-se a suspensão em meio de Löwenstein-Jensen e incuba-se a 37 °C durante 6 semanas. Durante as primeiras 48 horas, o tubo deve ser incubado na horizontal com a tampa ligeiramente aberta, e, posteriormente, na vertical e hermeticamente fechado. Se o meio apresentar crescimento, realiza-se a coloração de Ziehl-Neelsen nas colónias suspeitas de *Mycobacterium spp.*, devendo o isolado ser enviado para o Hospital de Aveiro para identificação da espécie e realização de antibiograma.

6. f. Exsudados purulentos

Os exsudados purulentos podem ser originários de uma variedade de lesões cutâneas, tais como, foliculite, impetigo e úlceras de pressão ou vasculares. Em particular, as úlceras apresentam uma grande quantidade de tecidos necrosados, o que favorece a colonização por bactérias contaminantes e dificulta a determinação do agente etiológico. Assim, é necessária a distinção do microrganismo responsável pela infeção na valorização dos resultados. (Fonseca *et al.*, 2004) Para isto, deve-se ter em conta o local anatómico da lesão e a microbiota da pele que é principalmente constituída por difteróides, *Staphylococcus epidermidis* e *Propionibacterium acnes*. (Tille, 2017)

As amostras usualmente recebidas no laboratório são exsudados provenientes de lesões superficiais, sendo a sua colheita realizada após a limpeza da superfície da lesão com líquido

estéril (água destilada ou soro fisiológico) e remoção dos tecidos necrosados. Com o auxílio de uma zaragatoa esterilizada deve-se esfregar toda a base da lesão, evitando contaminação pela flora de pele, e proceder ao seu envio para o laboratório em meio de transporte Stuart ou Amies. (Fonseca *et al.*, 2004)

O exame direto a fresco pretende averiguar a presença de leucócitos ou eritrócitos no exsudado, e coloração de Gram do esfregaço tem como objetivo a observação do tipo de microrganismo presente. Quanto ao exame cultural, realiza-se a inoculação de gelose de sangue, meio de MacConkey, gelose de Chapman e meio CLED. Adicionalmente, procede-se à sementeira em Sabouraud quando solicitado pelo clínico. A incubação dos meios de cultura é feita por 24-48 horas a 37 °C e em aerobiose, com exceção da gelose de sangue que é incubada numa atmosfera de 5% de CO₂. No caso do crescimento de mais do que uma espécie, pode-se fazer o isolamento para meio CHROMagar Orientation ou gelose de sangue. Por último, realiza-se a identificação e o antibiograma das colónias clinicamente relevantes.

6. g. Hemocultura

A hemocultura realiza-se na suspeita de bacteriémia ou septicémia. Os agentes etiológicos mais frequentemente isolados nestes casos são *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e anaeróbios como *Bacteroides* spp.. Contudo, a amostra de sangue pode facilmente ser contaminada pela microbiota da pele durante a punção venosa, sendo importante fazer a distinção. (Mahon *et al.*, 2015)

Antes da punção venosa, o local deverá ser desinfetado com álcool a 70%. Após a desinfecção da rolha do frasco com álcool, o sangue aspirado deve ser inoculado diretamente para o frasco de hemocultura, que deverá ser conservado a 37 °C ou à temperatura ambiente. (Fonseca *et al.*, 2004)

Após 24 horas, 72 horas e 7 dias de incubação a 37 °C, o sangue é repicado para gelose de sangue e gelose de chocolate, e são preparados esfregaços corados pelo método de Gram para observação da presença e morfologia dos microrganismos. As subculturas são incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ durante 48 horas. Se não se verificar crescimento nestes meios, o resultado da hemocultura é dado como negativo. No caso de subculturas com crescimento, avalia-se a relevância clínica do microrganismo tendo em conta a presença de uma cultura pura ou polimicrobiana, e se se trata de um contaminante ou de um patogéneo.

6. h. Fragmentos de unha

As micoses cutâneas incluem as onicomicoses que podem ser causadas por dermatófitos dos géneros *Trichophyton*, *Epidermophyton*, e *Microsporum*, ou por outros fungos como *Candida* spp. e *Scopulariopsis brevicaulis*. As unhas dos pés tendem a ser mais afetadas, e o agente etiológico mais comum é o *Trichophyton rubrum*. (Murray et al., 2016)

Nesta amostra apenas se realiza o exame micológico, sendo preferido o raspado da unha em vez de fragmentos. A colheita deve ser feita por raspagem da unha com um bisturi esterilizado após desinfeção do local. O exame direto é realizado após incubação do raspado em KOH (hidróxido de potássio) a 10% à temperatura ambiente. Na observação microscópica, são pesquisadas hifas hialinas, bem como formas leveduriformes. No exame cultural, a amostra é semeada em Sabouraud com cloranfenicol a 30 °C em aerobiose durante um mês. A identificação dos fungos filamentosos é efetuada através da avaliação macroscópica da morfologia das colónias e da observação microscópica das colónias numa preparação em azul de lactofenol. As colónias características de *Candida* spp. são repicadas para o meio CandiSelect.

6. i. Identificação de microrganismos

A identificação dos microrganismos isolados pode ser confirmada através de provas bioquímicas, ou, quando estas são insuficientes, através de cartas de identificação pelo VITEK® 2 Compact (bioMérieux).

6. i. i. Provas bioquímicas

1. Teste da catalase

A catalase é uma enzima produzida por algumas bactérias capaz de hidrolisar o peróxido de hidrogénio, originando água e oxigénio ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$), e inibindo assim os efeitos tóxicos do peróxido. Desta forma, a formação de bolhas de oxigénio após a adição de peróxido de hidrogénio às colónias isoladas indica a produção de catalase pela bactéria em questão. Este teste é útil na confirmação do género *Staphylococcus*, e na diferenciação de estafilococos e estreptococos. (Tille, 2017)

2. Teste da coagulase

A coagulase é um fator de virulência produzido por *S. aureus*. O kit Pastorex™ Staph-Plus (Bio-Rad, Hercules, E.U.A.) consiste num teste de aglutinação em látex para a deteção simultânea do fator de aglutinação (*clumping factor*), da proteína A e dos polissacarídeos capsulares de *S. aureus*, permitindo assim a aglutinação de estirpes capsuladas e não capsuladas.

Este teste é usado para a diferenciação desta espécie dos estafilococos coagulase-negativa. (Pastorex, 2018)

3. Teste da oxidase

O teste da oxidase pesquisa o sistema enzimático citocromo oxidase, que oxida o citocromo c. O laboratório usa as tiras Oxidase Test Stick (Liofilchem). No teste, a tetrametil-*p*-fenilenodiamina irá reduzir o citocromo c oxidado, formando um composto corado roxo. O teste da oxidase é utilizado na diferenciação de enterobactérias, que são oxidase negativa, e *Pseudomonas* spp., que é oxidase positiva. É ainda útil na identificação de *Neisseria* spp. e de *Campylobacter* spp.. (Tille, 2017)

6. i. ii. Identificação microbiana automatizada

O analisador VITEK® 2 Compact (bioMérieux) permite a realização da identificação de modo automatizado através de tecnologia baseada no crescimento bacteriano. Para a identificação, são usadas as cartas GN, GP e NH cujas indicações se encontram na Tabela IV. Estas cartas apresentam múltiplos poços com diferentes substratos e reagentes colorimétricos que permitem a leitura das diferentes atividades metabólicas. Primeiramente, procede-se à preparação da suspensão das colónias isoladas em solução salina estéril com a turvação adequada. No equipamento, as cartas de identificação são inoculadas com estas suspensões, seladas e incubadas no equipamento a 35 °C. A cada 15 minutos, as reações nos poços são lidas por transmitância a diferentes comprimentos de onda, e são depois novamente incubadas. As reações lidas são interpretadas automaticamente e comparadas com a base de dados para determinação da espécie bacteriana. (Jusuf *et al.*, 2020)

6. j. Testes de suscetibilidade antimicrobiana

O teste de suscetibilidade antimicrobiana (TSA), ou antibiograma, dos microrganismos isolados são usualmente realizados de forma automatizada no analisador VITEK® 2 Compact (bioMérieux). Porém, podem também ser executados manualmente pelo método de Kirby-Bauer no caso de impossibilidade ou inconveniência do método automático.

6. j. i. TSA manual

O método de Kirby-Bauer ou método de difusão em disco permite a classificação da suscetibilidade pelo uso de discos com agentes antimicrobianos com concentrações predefinidas. A escolha dos antibióticos utilizados encontra-se dependente do microrganismo isolado. A suspensão bacteriana de turvação 0,5 McFarland é semeada em toalha em gelose

de Mueller-Hinton com o auxílio de uma zaragatoa. Para algumas bactérias, como estreptococos, realiza-se a inoculação em gelose de sangue para melhor crescimento. Após a inoculação, os discos são colocados na gelose, e esta é incubada em aerobiose a 37 °C por 16-18 horas. Posteriormente, os halos de inibição de crescimento microbiano são medidos, e os resultados são interpretados como suscetível, resistente ou suscetível com elevada exposição de acordo com as normas do EUCAST. (Mahon *et al.*, 2015)

6. j. ii. TSA automatizado

Para a realização do antibiograma pelo VITEK® 2 Compact (bioMérieux) são utilizadas as cartas AST listadas na Tabela IV. A metodologia é semelhante à utilizada para a identificação microbiana, contudo o princípio baseia-se na microdiluição em caldo para determinação da concentração mínima inibitória (CMI). As cartas AST apresentam vários poços contendo diferentes antibióticos. As cartas são inoculadas, seladas e incubadas no analisador, e a turbidez em cada poço é lida por transmitância a intervalos de 15 minutos. A partir das leituras de turbidez, são calculadas as CMI para cada antibiótico, e a suscetibilidade microbiana é classificada em suscetível, resistente ou suscetível com elevada exposição segundo as normas do EUCAST. (Benkova *et al.*, 2020)

Tabela IV: Cartas utilizadas pelo VITEK® 2 Compact (bioMérieux) e as suas aplicações.

Carta	Aplicação
GN	Identificação de bacilos de Gram negativo
GP	Identificação de microrganismos de Gram positivo
NH	Identificação de <i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i> e outros géneros fastidiosos
AST N355	TSA para <i>Enterobacterales</i>
AST N427	TSA para <i>Pseudomonas</i> spp. e <i>Acinetobacter</i> spp.
AST P648	TSA para <i>Staphylococcus</i> spp.
AST P586	TSA para <i>Enterococcus</i> spp. e <i>S. agalactiae</i>
AST ST03	TSA para <i>S. pneumoniae</i> , <i>Streptococcus</i> β -hemolíticos e <i>Streptococcus viridans</i>

7. Discussão de casos clínicos

7. a. Anemia ferropriva

No dia 14/03/2023, uma mulher de 29 anos apresentou-se no laboratório para fazer análises. Foram obtidos os resultados listados abaixo.

Tabela V: Resultados obtidos na Hematologia.

Hemograma		Valores de Referência		Resultados anteriores 12-01-2023
Eritrograma				
Eritrócitos	4,63	$\times 10^{12}/L$	3,80-4,80	4,49
Hemoglobina	7,8	g/dL	12,0-15,0	8,2
Hematócrito	28,3	%	36,0-46,0	29,2
VGM	61,1	fL	83,0-101,0	65,0
HGM	16,8	pg	27,0-34,0	18,3
CHGM	27,6	g/dL	31,5-34,5	28,1
RDW	17,8	%	11,5-14,5	19,7
Leucograma				
Leucócitos	7,53	%	4,00-11,00	9,78
Neutrófilos	67,3	%	5,1 $\times 10^9/L$	6,7
Eosinófilos	0,7	%	0,1 $\times 10^9/L$	0,1
Basófilos	0,5	%	0,0 $\times 10^9/L$	0,1
Linfócitos	23,4	%	1,8 $\times 10^9/L$	2,3
Monócitos	8,1	%	0,6 $\times 10^9/L$	0,6
Plaquetas				
MPV	400	$\times 10^9/L$	150-400	397
PDW	10,8	fL	7,4-11,0	10,1
	13,0	fL	9,8-16,2	11,7
Esfregaço sangue periférico	Anisopoiquilocitose acentuada com eritrócitos em charuto. Algumas plaquetas gigantes.			
Velocidade de Sedimentação	47	mm	<30	24

Tabela VI: Resultados obtidos na Bioquímica.

		Valores de referência	
Ferro	15	$\mu g/dL$	50-170
Capacidade total fixação Ferro	420	$\mu g/dL$	225-425
Ferritina	5	ng/dL	10-150
CRP Ultrasensível	34,1	mg/L	<1,0
Ácido Fólico	5,0	ng/dL	3,1-20,5

No eritrograma verificaram-se os valores mais alterados. A hemoglobina apresenta uma diminuição franca, indicando uma anemia moderada. Apesar do número de eritrócitos estar normal, o VGM encontra-se diminuído, o que justifica o hematócrito diminuído e corrobora a anemia. Os índices eritrocitários VGM, HGM e CHGM encontram-se marcadamente diminuídos, classificando a anemia como microcítica e hipocrômica. O valor de RDW aumentado sugere anisocitose eritrocitária.

A contagem de leucócitos e a fórmula leucocitária encontram-se dentro dos valores de referência, bem como todos os parâmetros do trombocitograma. De referir, que o estudo da coagulação realizado (tempo de protrombina e o tempo de tromboplastina parcialmente ativada) apresentava-se também dentro dos valores de referência.

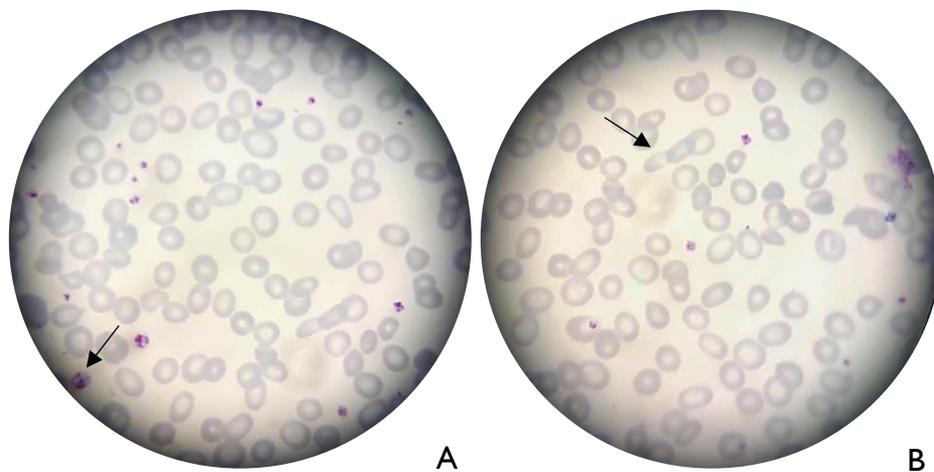


Figura 3: Esfregaço de sangue periférico (ampliação de 1000x). (Fotos tiradas no laboratório)

Com os valores do hemograma indicativos de anemia, procedeu-se à realização do esfregaço de sangue periférico. Na observação deste, verificou-se anisocitose acentuada com predomínio de eritrócitos microcíticos, corroborando o VGM diminuído e o RDW aumentado. Verificou-se também hipocromia de acordo com os valores diminuídos de HGM e de CHGM. Quanto à forma, os eritrócitos observados apresentaram poiquilocitose, principalmente, sob a forma de eritrócitos em charuto como indicado pela seta na Figura 3.B. Não foram verificadas alterações morfológicas na série leucocitária. Contudo, observaram-se algumas plaquetas gigantes tais como a indicada da Figura 3.A.

Com os valores do hemograma confirmados pelo esfregaço, pode-se concluir que se trata de uma anemia microcítica e hipocrômica, porém é necessário determinar a causa subjacente da anemia. As anemias microcíticas e hipocrômicas apresentam três principais causas: deficiência de ferro, doença crônica e traço talassémico.

Os eritrócitos em charuto observados estão frequentemente associados à deficiência de ferro. Em menor extensão, as células em alvo também são observadas na anemia ferropriva, bem como nas hemoglobinopatias. (Hoffbrand *et al.*, 2016) Adicionalmente, o RDW encontra-se aumentado na deficiência de ferro, e é geralmente normal no traço talassêmico. (Bain, 2016)

Desta forma, o hemograma e o esfregaço são sugestivos de anemia por deficiência de ferro. Porém, ainda que o hemograma auxilie no diagnóstico diferencial destas anemias, são necessários exames adicionais, tais como, o estudo do metabolismo do ferro.

Enquanto que a anemia ferropriva apresenta normalmente valores reduzidos de ferro sérico e ferritina, e a capacidade total de fixação do ferro (TIBC) aumentada, na anemia da doença crônica verifica-se ferro sérico e TIBC diminuídos, e ferritina aumentada. Já no traço talassêmico todos os parâmetros do ferro estão normais. (Hoffbrand *et al.*, 2016)

Assim, foram realizados testes bioquímicos do estudo do metabolismo do ferro que revelaram o ferro sérico muito diminuído, a ferritina diminuída, e a TIBC relativamente elevada ainda que dentro do intervalo de referência. Foi ainda determinado o ácido fólico que se encontrava normal. Estes resultados confirmam o diagnóstico de anemia por deficiência de ferro.

Nas anemias ferroprivas, a resposta plaquetar é muito variável, contudo estão descritos casos em que se verifica a presença de plaquetas gigantes e de trombocitose ligeira a moderada. A ocorrência destes casos é justificada pela trombocitose reativa que consiste na ativação da medula óssea, resultando nas alterações referidas. (Park *et al.*, 2012) Apesar da utente não ter desenvolvido trombocitose, a contagem plaquetar encontra-se relativamente elevada, ainda que dentro dos valores de referência. Assim, esta contagem em conjunto com a observação de plaquetas gigantes no esfregaço é consistente com o fenómeno de trombocitose reativa.

Todavia, é ainda imperativa a investigação da causa da deficiência de ferro através da história clínica, do exame físico ou de exames complementares. (Bain, 2016)

Em países desenvolvidos, a deficiência de ferro é normalmente o resultado de perdas de sangue crónicas, em particular uterinas e gastrointestinais, sendo raro o desenvolvimento de anemia exclusivamente por ingestão insuficiente de ferro ou por malabsorção. Contudo, certos grupos demográficos têm necessidade de maiores quantidades de ferro, apresentando

um risco aumentado de desenvolver anemia. São eles crianças, adolescentes, grávidas, lactantes e mulheres em idade reprodutiva. (Hoffbrand *et al.*, 2016)

Sendo a utente uma mulher de 29 anos, encontra-se certamente num dos três últimos grupos referidos, podendo a anemia advir da falta de suplementos de ferro durante a gravidez ou a lactação, ou de menstruações intensas e/ou prolongadas. A anemia pode-se também dever a úlceras no trato gastrointestinal não tratadas.

Os resultados das análises datadas de dois meses antes demonstram uma ligeira acentuação da anemia, bem como da microcitose e da hipocromia. Estes dados sugerem que apesar de já se ter verificado uma anemia moderada anteriormente, não foi instituído tratamento. A administração de suplementos de ferro orais teria provavelmente restabelecido os resultados do eritrograma até certo ponto. Verificar-se-ia ainda dimorfismo eritrocitário no exame do esfregaço de sangue periférico, com a observação de uma população de eritrócitos microcíticos e hipocrómicos e outra população normocítica e normocrómica. Este dimorfismo é característico das fases iniciais do tratamento da anemia ferropriva. (Shokrgozar *et al.*, 2019)

Uma vez que o Avelab é um laboratório de ambulatório, não é facultado o acesso aos sintomas dos utentes. No entanto, tendo em conta o grau de anemia verificado é possível especular sobre os aspetos clínicos que poderá apresentar. Nas anemias moderadas, é esperada a manifestação de fadiga, palidez e dispneia de esforço, isto é, dificuldade em respirar aquando da realização de atividades que antes não exigiam muito esforço. (Bain, 2016)

A velocidade de sedimentação (VS) e a proteína C reativa (CRP) encontram-se acima dos valores de referência, apresentando uma aumento franco.

A VS e a CRP são indicativas de um estado inflamatório que se poderá dever às mais variadas etiologias. Estes marcadores de fase aguda encontram-se elevados durante as fases ativas de doenças inflamatórias crónicas, quando se verificam neoplasias malignas, e após lesão tecidual ou lesão física. (Bain *et al.*, 2017)

Assim, pode-se concluir que a utente se encontra num estado inflamatório, porém não é possível determinar a sua causa subjacente sem o histórico clínico ou exames complementares.

7. b. Leucemia linfocítica crônica

No dia 27/03/2023, uma utente de 83 anos dirigiu-se ao laboratório. Foram realizadas as análises com os resultados obtidos abaixo.

Tabela VII: Resultados obtidos na Hematologia.

Hemograma				Valores de Referência	Resultados anteriores			
					29-06-2022	02-11-2021	12-03-2021	
Eritrograma								
Eritrócitos	2,76	$\times 10^{12}/L$		3,80-4,80	3,46	3,64	3,73	
Hemoglobina	8,9	g/dL		12,0-15,0	11,4	11,9	12,4	
Hematócrito	27,7	%		36,0-46,0	35,3	36,8	38,1	
VGM	100,4	fL		83,0-101,0	102,0	101,1	102,1	
HGM	32,2	pg		27,0-34,0	32,9	32,7	33,2	
CHGM	32,1	g/dL		31,5-34,5	32,3	32,3	32,5	
RDW	14,0	%		11,5-14,5	13,2	13,5	13,4	
Leucograma								
Leucócitos	38,50	%		4,00-11,00	40,91	58,56	50,14	
Neutrófilos	9,8	%	3,8	$\times 10^9/L$	1,5-6,9	3,3	3,7	3,1
Eosinófilos	0,4	%	0,2	$\times 10^9/L$	<0,4	0,1	0,1	0,1
Basófilos	0,2	%	0,1	$\times 10^9/L$	<0,1	0,0	0,1	0,1
Linfócitos	88,8	%	34,2	$\times 10^9/L$	1,5-4,0	37,2	54,3	46,6
Monócitos	0,8	%	0,3	$\times 10^9/L$	0,2-0,8	0,3	0,4	0,3
Plaquetas								
MPV	11,3	fL		150-400	157	179	168	
PDW	13,1	fL		7,4-11,0	11,1	10,7	11,0	
Esfregaço sangue periférico								
Manchas de Gümprecht. Linfócitos atípicos.								
Velocidade de Sedimentação								
	16	mm		<30	9	11	5	

Tabela VIII: Resultados obtidos na Bioquímica.

				Valores de Referência	Resultados anteriores		
					29-06-2022	02-11-2021	12-03-2021
Glicose	87	mg/dL		70-110	86	94	83
Ureia	22	mg/dL		21-43	30	39	31
Creatinina	0,66	mg/dL		0,57-1,11	0,70	0,73	0,72
Ácido úrico	3,2	mg/dL		2,6-6,0	3,7	3,3	3,6
Ionograma							
Sódio	141	mEq/L		135-145	141	141	139
Potássio	4,6	mEq/L		3,6-5,0	4,7	4,7	5,3
Cloro	106	mEq/L		101-109	104	104	104

Colesterol total	138	mg/dL	<190	147	165	144
Colesterol HDL	36	mg/dL	Favorável>45 Desfavorável<35	40	42	40
Colesterol LDL	39	mg/dL	<130	96	104	86
Triglicérides	64	mg/dL	<150	54	93	91
AST	18	U/L	<35	24	21	19
ALT	9	U/L	<35	18	16	9
Gama-G.T.	9	U/L	9-36	11	11	10
Desidrogenase do Lactato (LDH)	116	U/L	125-220	130	126	134
CRP Ultrasensível	<0,2	mg/L	<1,0	0,3		
CK	25	U/L	<145	25	24	30

A contagem de eritrócitos, a hemoglobina e o hematócrito apresentam valores abaixo do intervalo de referência. Estes valores são concordantes entre si e indicam a presença de uma anemia moderada. Os restantes parâmetros do eritrograma estão normais, permitindo classificar a anemia como normocítica e normocrômica. O leucograma está francamente alterado com uma contagem de leucócitos muito acima do esperado. A fórmula leucocitária encontra-se alterada com uma evidente linfocitose, sendo esta a clara responsável pela leucocitose. De realçar, que a linfocitose perdura há mais de dois anos. O trombocitograma encontra-se normal, verificando-se apenas um ligeiro aumento do volume plaquetar médio.

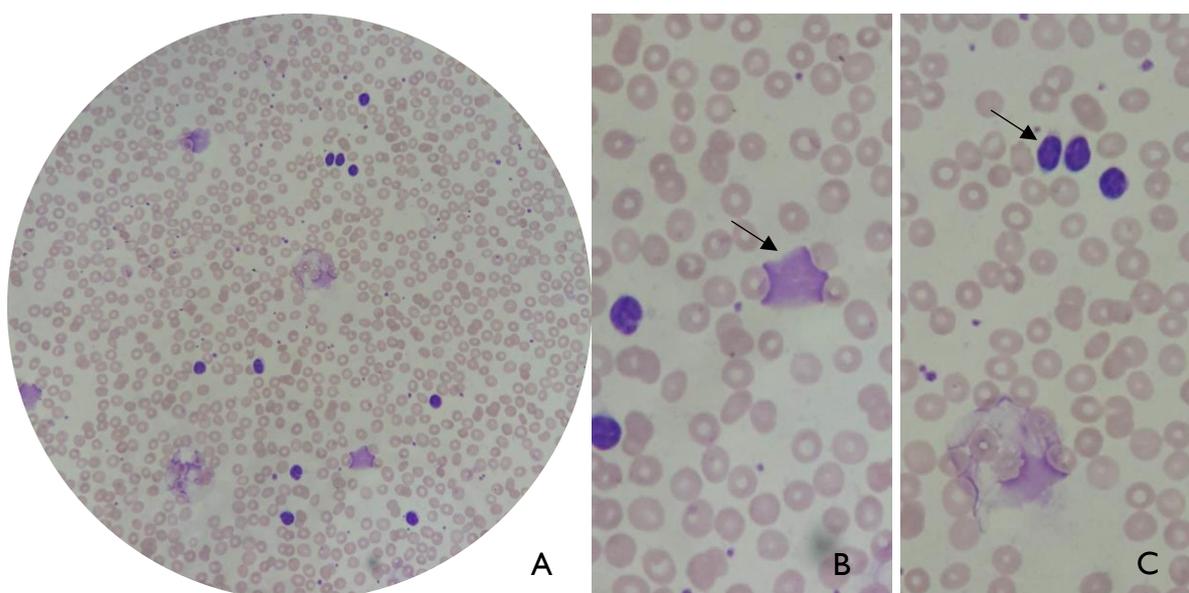


Figura 4: Campo observado do esfregaço de sangue periférico (A) com detalhes das células e artefactos encontrados (B e C) (ampliação de 500x). (Fotos tiradas no laboratório)

De seguida, procedeu-se ao esfregaço de sangue periférico devido à anemia e às alterações verificadas no leucograma. Foi observada uma população eritrocitária sem alterações morfológicas relevantes. O esfregaço permitiu confirmar a leucocitose e a linfocitose, estando presente uma elevada percentagem de linfócitos. Quanto à sua morfologia, os linfócitos observados eram atípicos, apresentando um tamanho reduzido, cromatina fortemente condensada e citoplasma escasso, como os indicados na Figura 4.C. Foi ainda possível a observação de múltiplas manchas de Gümprecht, como a evidenciada na Figura 4.B. Por último, as plaquetas exibiam uma morfologia normal.

Os parâmetros bioquímicos avaliados encontram-se dentro dos valores de referência, nomeadamente, os marcadores renais, o ionograma, o perfil lipídico, as enzimas hepáticas, bem como, a glicose, a proteína C reativa e a creatina cinase. Apenas a lactato desidrogenase apresenta um nível ligeiramente inferior ao normal.

O hemograma e o esfregaço são sugestivos de uma leucemia linfocítica crónica (LLC). A utente apresenta os principais indicadores desta patologia, como uma idade já avançada, e uma linfocitose superior a $5 \times 10^9/L$ que persiste há mais de três meses. A predominância de linfócitos pequenos no esfregaço, juntamente com a observação de manchas de Gümprecht auxiliam também o diagnóstico. (Hoffbrand *et al.*, 2019)

As manchas de Gümprecht são características da LLC, e consistem num artefacto do esfregaço que não se verifica *in vivo*. Tratam-se de linfócitos com elevada fragilidade membranar que são desintegrados na preparação do esfregaço de sangue. (Bain, 2016)

A LLC é uma neoplasia constituída por linfócitos B monoclonais maduros que apresentam capacidade apoptótica deficiente. Isto resulta num tempo de vida celular prolongado, levando à sua acumulação no sangue periférico, medula óssea, fígado, baço e nódulos linfáticos. (Hoffbrand *et al.*, 2016)

Contudo, são necessários exames de imunofenotipagem para a confirmação do diagnóstico, podendo-se proceder ainda a exames complementares, como a análise citogenética e a biópsia de medula óssea. A LLC é confirmada pela presença da proteína CD19 à superfície dos linfócitos, identificando-os como células B, e também pela baixa densidade de imunoglobulinas de superfície, bem como, pela expressão de apenas uma cadeia leve. É ainda característica a expressão das proteínas de superfície CD25 e CD23. (Hoffbrand *et al.*, 2016) Nos estudos citogenéticos, geralmente, por hibridização fluorescente *in situ* (FISH), as anormalias cromossómicas mais frequentemente associadas à LLC são: a deleção do braço longo do

cromossoma 13 – del(13q) –, a deleção do braço curto do cromossoma 17 – del(17p) –, a trissomia 12, e a del(11q). Na LLC, o estudo da medula óssea revela substituição extensiva dos normais elementos da medula por linfócitos. (Hoffbrand *et al.*, 2019)

Nas fases iniciais da LLC, é frequente a ausência de sintomatologia, sendo o diagnóstico muitas vezes feito após um hemograma de rotina. Contudo, no decorrer da LLC pode-se verificar o aumento dos gânglios linfáticos. Nas fases mais tardias, é comum o desenvolvimento de esplenomegalia e de hepatomegalia. (Hoffbrand *et al.*, 2019)

Esta patologia pode ser estadiada de acordo com a extensão do envolvimento dos órgãos linfóides, e com a existência de anemia ou trombocitopenia. (Hoffbrand *et al.*, 2019) Na Tabela IX, consta a classificação de Rai para o estadiamento da LLC. Segundo esta classificação, e considerando a anemia apresentada pela utente de 8,9 g/L de hemoglobina, esta leucemia poderá situar-se no estágio III.

Tabela IX: Estadiamento da LLC segundo a classificação de Rai. Adaptado de (Hoffbrand *et al.*, 2016)

Estádio	
0	Linfocitose $> 5 \times 10^9/L$
I	Estádio 0 + adenopatia
II	Estádio 0 + organomegalia (fígado e/ou baço) \pm adenopatia
III	Estádio 0 + anemia (Hb < 100 g/L) \pm adenopatia \pm organomegalia
IV	Estádio 0 + trombocitopenia (plaquetas $< 100 \times 10^9/L$) \pm adenopatia \pm organomegalia

O desenvolvimento de anemia normocítica e normocrômica e de trombocitopenia em fases mais tardias da doença pode ser justificado pelo hiperesplenismo. Com a esplenomegalia, dá-se o aumento da filtração e a consequente destruição de eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Assim, o aumento do baço resulta em citopenias. (Lv, 2016) Alternativamente, a anemia e a trombocitopenia podem-se também dever à infiltração medular pelas células neoplásicas. (Hoffbrand *et al.*, 2016)

Confrontando o histórico da utente, verifica-se que a linfocitose se tem mantido há já pelo menos dois anos, e que a anemia se tem vindo a acentuar paulatinamente. Assim, pode-se depreender que a doença tem vindo a progredir.

Apesar do desconhecimento de sintomatologia clínica devido ao estatuto de laboratório de ambulatório, pode-se especular sobre os sintomas apresentados pela utente com base nas análises. Assim, pode-se supor que a utente apresenta adenopatias, e possivelmente esplenomegalia uma vez que já se constata a presença de anemia.

7. c. Candidíase vulvovaginal e vaginose bacteriana

No dia 23/05/2023, uma mulher de 20 anos dirigiu-se ao laboratório para realizar o exame bacteriológico, micológico e parasitológico do exsudado vaginal.

Chegada ao laboratório a amostra foi processada. No exame direto a fresco foram observadas muitas células epiteliais de descamação, muitas 'clue cells' e numerosos leucócitos, não tendo sido observados eritrócitos. Não foram visualizados parasitas flagelados, sendo a pesquisa de *Trichomonas vaginalis* negativa. O esfregaço do exsudado vaginal foi corado pelo Gram, e foram observados numerosos cocobacilos de Gram variável e algumas pseudohifas, verificando-se a ausência de bacilos de Döderlein. A visualização de pseudohifas e de leucócitos é, desde já, sugestiva de infecção por leveduras, provavelmente, candidíase. A observação de cocobacilos de Gram variável e 'clue cells', aliada à ausência de bacilos de Döderlein é indicativa de outra infecção, a vaginose bacteriana por *Gardnerella vaginalis*.

Para o exame cultural, realizou-se inicialmente a inoculação de gelose de chocolate e de Sabouraud. A gelose de chocolate foi incubada a 37 °C na jarra de Gaspak em atmosfera de 5% de CO₂, enquanto que o meio de Sabouraud foi incubado a 37 °C em aerobiose. Após 24 horas de incubação, os meios foram interpretados.

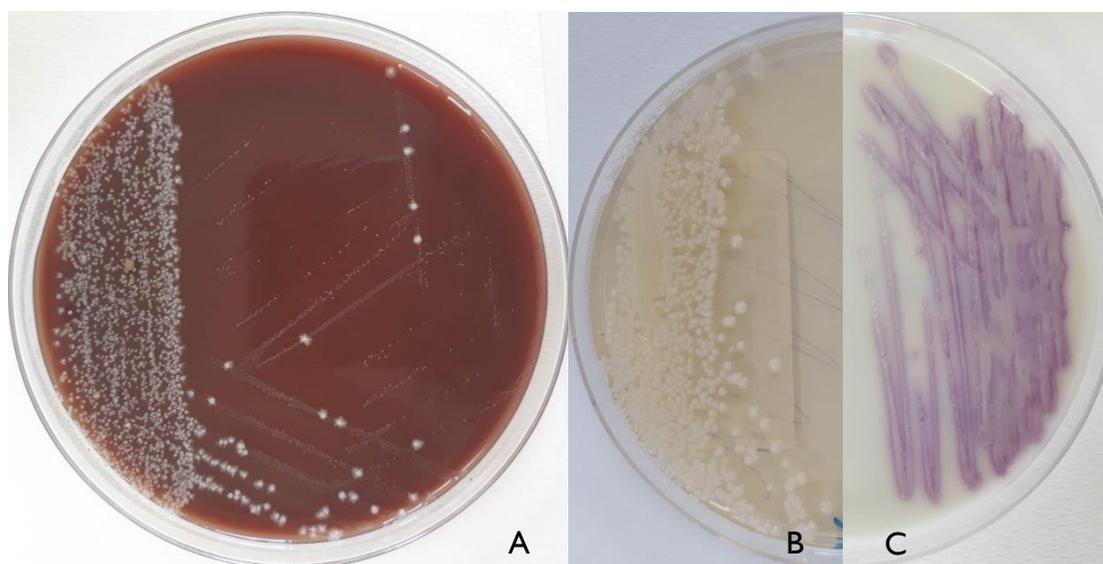


Figura 5: Meios de cultura semeados. (A) Gelose de chocolate; (B) Meio de Sabouraud; (C) Meio CandiSelect. (Fotos tiradas no laboratório)

Na gelose de chocolate (Fig. 5.A) foi identificado o crescimento de microbiota comensal vaginal. Na placa de Sabouraud (Fig. 5.B) são visíveis colónias brancas características de *Candida* spp.. Realizou-se a repicagem de uma destas colónias para meio CandiSelect que foi incubado

a 37 °C em aerobiose. Após 24 horas, este meio (Fig. 5.C) foi interpretado, e sendo um meio cromogénico é possível a identificação direta de *Candida albicans* pelo crescimento de colónias roxas típicas. Deste modo, a suspeita de candidíase vulvovaginal na coloração de Gram foi confirmada pelo exame cultural.

A composição da microbiota vaginal está sujeita a mudanças consoante as alterações hormonais e a idade. Em idades pré e pós-reprodutivas, a microbiota vaginal é constituída principalmente por fungos, bacilos de Gram negativo e cocos de Gram positivo. Em idade reprodutiva, os elevados níveis de estrogénio levam a uma maior concentração de glicogénio cuja metabolização pelos lactobacilos contribui para a manutenção de um baixo pH. Esta acidez promove um ambiente hostil para o crescimento de múltiplos microrganismos. Contudo, o baixo pH também favorece a colonização vaginal por lactobacilos, bacilos anaeróbicos de Gram negativo e cocos de Gram positivo. Esta colonização vaginal é benéfica para a mulher, contudo alguns dos microrganismos integrantes desta flora são oportunistas, e podem causar infeção quando se verificam alterações no habitat ou quando a resposta imunitária se encontra reduzida. Nestas condições, também é comum a infeção por espécies não comensais. (Mahon *et al.*, 2015)

A vaginose bacteriana deve-se a um crescimento excessivo de bactérias anaeróbias da microbiota vaginal normal que não está necessariamente associado a uma resposta leucocitária. A predominância fisiológica de lactobacilos é substituída por estas bactérias, nomeadamente, *G. vaginalis*, resultando na alcalinização do pH vaginal para valores superiores a 4,5, e num odor característico. Este odor a peixe deve-se à presença de aminas aromáticas que podem ser detetadas pela intensificação do cheiro do exsudado quando lhe é adicionado KOH a 10%. Apesar da *G. vaginalis* estar normalmente presente na microbiota vaginal, quando presente em grandes quantidades leva à formação de 'clue cells' que são patognomónicas de vaginose bacteriana. (Murray *et al.*, 2007) Assim, apesar da observação de cocobacilos de Gram variável sugestivos de *G. vaginalis*, de 'clue cells' e da ausência de lactobacilos ser suficiente, poder-se-ia ter realizado a determinação do pH e o teste das aminas para consolidar o diagnóstico de vaginose bacteriana.

A *Candida spp.* é uma levedura integrante da flora vaginal cuja proliferação exagerada ocorre em situações de maior fragilidade do hospedeiro. Alguns dos fatores predisponentes à candidíase vulvovaginal são gravidez, diabetes, infeção por HIV e toma de contraceptivos orais, corticoesteróides sistémicos e antibióticos. Este fungo oportunista consegue tornar-se patogénico mesmo com o pH ácido fisiológico, e desencadeia uma resposta inflamatória. A espécie

isolada mais frequentemente é a *C. albicans*, existindo também um número considerável de infecções por *C. glabrata*. Embora o diagnóstico padronizado de candidíase vulvovaginal deva ser feito por exame cultural, a observação microscópica de leveduras e pseudohifas associada à presença de leucócitos é também pertinente. (Murray *et al.*, 2016)

Enquanto que a candidíase vulvovaginal se caracteriza por um corrimento abundante esbranquiçado e inodoro, a vaginose bacteriana cursa com um corrimento semelhante, mas com um odor característico. Deste modo, pode-se especular que a utente apresentava corrimento abundante esbranquiçado com odor a peixe, acrescido ao prurido típico de ambas as infecções. (Tille, 2017)

7. d. Infecção por *Staphylococcus aureus*

No dia 29/05/2023, uma utente de 47 anos dirigiu-se ao laboratório para realizar o exame bacteriológico de um exsudado purulento proveniente da virilha.

Chegada ao laboratório a zaragatoa foi processada. No exame direto a fresco do exsudado foram observados muitos leucócitos e muitos eritrócitos, sendo a presença de leucócitos indicativa de infecção. No exame direto corado pelo Gram, verificou-se a presença de alguns cocos de Gram positivo, não sendo referido o tipo de agrupamento presente. A observação destas bactérias em cacho ou em cadeia identificá-las-ia como estafilococos ou estreptococos, respetivamente.

Com a zaragatoa da colheita foi realizada a inoculação de quatro meios de cultura: gelose de sangue, gelose de Chapman, meio de CLED e gelose de MacConkey. Os últimos três meios foram incubados a 37 °C em aerobiose, enquanto que a gelose de sangue foi incubada a 37 °C numa jarra de Gaspak em atmosfera de 5% de CO₂. Os meios foram observados às 24 horas de incubação, e reincubados novamente por mais 24 horas para melhor crescimento dos microrganismos.

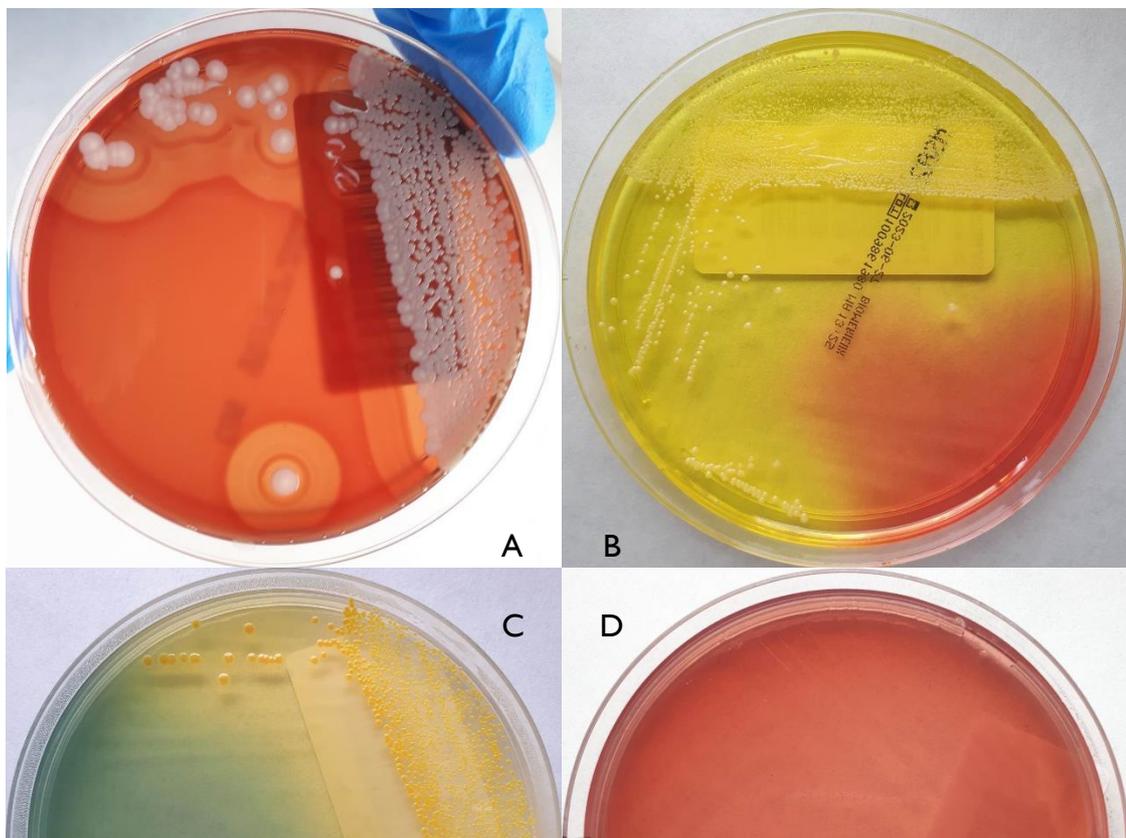


Figura 6: Meios de cultura semeados. (A) Gelose de sangue; (B) Gelose de Chapman; (C) Meio de CLED; (D) Gelose de MacConkey. (Fotos tiradas no laboratório)

Assim, os meios foram interpretados após cerca de 48 horas de incubação, podendo ser observados na Figura 6. O crescimento de colónias amarelas na gelose de Chapman (Fig. 6.B) permite a identificação direta de *Staphylococcus aureus*, uma vez que o meio é seletivo para estafilococos pela concentração de 7,5% de NaCl, e diferencial para *S. aureus* pela fermentação de manitol indicada pelo vermelho de fenol. Sendo a gelose de MacConkey um meio seletivo para bacilos de Gram negativo pela presença de sais biliares e cristal violeta, a ausência de colónias neste meio (Fig. 6.D) informa-nos sobre a ausência destas bactérias na amostra. O crescimento de colónias amarelas no meio de CLED (Fig. 6.C) indica a fermentação da lactose revelada pelo azul de bromotimol. (BD, 2012) Desta forma, as colónias presentes no meio de CLED e as colónias brancas β -hemolíticas presentes na gelose de sangue (Fig. 6.A) são consistentes com a bactéria identificada na gelose de Chapman, *S. aureus*. Esta identificação foi contudo confirmada pela realização da prova da coagulase que foi positiva.

Deste modo, a presença de leucócitos no exame citológico e a obtenção de uma cultura pura permitem afirmar que se trata realmente de uma infeção por *S. aureus*. Restava apenas a execução do antibiograma que foi realizado no VITEK® 2 Compact (bioMérieux) com a carta AST P648, tendo-se obtido os seguintes resultados:

Ampicilina	R
Penicilina	R
Amoxicilina/Ácido clavulânico	S
Gentamicina	S
Tetraciclina	S
Levofloxacina	I
Trimetoprim/Sulfametoxazol	R
Eritromicina	S
Clindamicina	S

R – resistente; S – suscetível; I – suscetível com elevada exposição.

S. aureus é uma bactéria halotolerante, aeróbica facultativa, fermentadora do manitol e da lactose. Como os demais estafilococos é catalase positiva, e é a única espécie humana coagulase positiva. (Murray *et al.*, 2007) Um dos fatores de virulência apresentados por esta bactéria é a produção de hemolisinas alfa, beta, gama e delta. (Mahon *et al.*, 2015)

Esta bactéria pode causar doença pela produção de toxinas, tais como intoxicação alimentar, síndrome de pele escaldada estafilocócica e síndrome do choque tóxico. Pode também causar infeções pela invasão direta, sendo que estas resultam da proliferação da bactéria, originando destruição do tecido e formação de abscessos. São exemplos as infeções cutâneas, bacteriemia, pneumonia e osteomielite. (Murray *et al.*, 2016)

Tendo em consideração que a bactéria foi isolada a partir de uma lesão supurativa superficial na virilha, as hipóteses de infeções mais prováveis nesta utente são foliculite e furúnculo. A foliculite é uma infeção supurativa dos folículos pilosos, na qual a base destes se encontra inflamada, existindo uma pequena acumulação de pus sob a epiderme. O furúnculo é uma extensão da foliculite, consistindo num nódulo maior e doloroso, no qual se acumula tecido necrotizado. Ainda de referir que *S. aureus* é responsável por mais de 90% das infeções cutâneas. (Murray et al., 2016)

8. Conclusão

Este estágio curricular constitui a conclusão deste ciclo acadêmico que me permitiu uma melhor compreensão das análises clínicas. Esta área multidisciplinar representa um grande contributo na prestação de cuidados de saúde através da garantia da fiabilidade dos resultados obtidos. Sendo este o meu primeiro contacto com a realidade de um laboratório, estes seis meses revelaram-se uma experiência enriquecedora tanto a nível profissional, como pessoal.

As unidades curriculares do Mestrado em Análises Clínicas equipam o estudante com as ferramentas necessárias para a compreensão das metodologias praticadas e da validação de resultados. Desta forma, foi-me possível aplicar os conhecimentos teóricos adquiridos e adquirir novos conhecimentos teóricos e práticos por meio do acompanhamento da rotina laboratorial. A autonomia que me foi dada na execução supervisionada de várias técnicas manuais e automatizadas possibilitou-me o desenvolvimento da capacidade de resolução de problemas e de espírito crítico.

A forma como fui recebida por toda a equipa do Avelab e envolvida na rotina do laboratório, passando pela tragem, processamento e eliminação de amostras, consolidou a importância da noção de ajuda e de comunicação entre os profissionais.

Considero que este estágio apresentou uma lacuna, uma vez que não me foi possível realizar colheitas. Assim, não adquiri experiência prática neste domínio essencial para os profissionais recentemente formados.

A experiência laboratorial conferida por este estágio proporcionou-me maior destreza técnica e maior confiança nas capacidades adquiridas ao longo do mestrado. Considero ainda que este estágio oferece uma boa preparação para o ingresso no mercado de trabalho, tendo fomentado a minha vontade de prosseguir na área das análises clínicas.

9. Referências bibliográficas

- AVCIOGLU, G. *et al.* – **Comparison of noninvasive and invasive point-of-care testing methods with reference method for hemoglobin measurement.** *Journal of Clinical Laboratory Analysis.* 32(3) (2017) e22309.
- BAIN, Barbara J. – **Células sanguíneas: um guia prático.** 5ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. ISBN 978-85-8271-331-0.
- BAIN, Barbara J. ; BATES, Imelda ; LAFFAN, Michael A. – **Dacie and Lewis Practical Haematology.** 12ª Ed. Reino Unido: Elsevier, 2017. ISBN 978-0-7020-6696-2.
- BENKOVA, M. ; SOUKUP, O. ; MAREK, J. – **Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice.** *Journal of Applied Microbiology.* 129(4) (2020) 806-822.
- BD CLED Agar.** [Bula]. Heidelberg, Alemanha: Becton Dickinson GmbH (2012).
- BOSWIHI, S. S. ; UDO, E. E. – **Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: An update on the epidemiology, treatment options and infection control.** *Current Medicine Research and Practice,* 8(1) (2018) 18–24.
- BRULÉ, J. *et al.* – **Evaluation of the coagulometer STA R Max® (Stago) for routine coagulation parameters.** *Annales de Biologie Clinique,* 76(2) (2018) 143–149.
- DING, L. *et al.* – **Hemoglobin A1c and diagnosis of diabetes.** *Journal of Diabetes,* 10(5) (2018) 365–372.
- Direção-Geral da Saúde – **Norma nº 037/2011 de 30/09/2011 atualizada a 20/12/2013.** Lisboa, 2013.
- Direção-Geral de Saúde – **Norma nº 018/2014 de 09/12/2014 atualizada a 27/04/2015.** Lisboa, 2014.
- FLORES-MIRELES, A. *et al.* – **Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options.** *Nature Reviews Microbiology.* 13 (2015) 269–284.
- FONSECA, A. *et al.* – **Orientações para a elaboração de um Manual de Boas Práticas em Bacteriologia.** Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge/Programa Nacional de controlo de infeção, 2004.
- GastroVir K-SeT.** [Bula]. Gembloux, Bélgica: Coris BioConcept (2023).

- Giardia Card.** [Bula]. Roseto degli Abruzzi, Itália: Liofilchem (2015).
- HO, J. ; Marks, G. B. ; Fox, G. J. – **The impact of sputum quality on tuberculosis diagnosis: a systematic review.** The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. 19(5) (2015) 537–544.
- HOFFBRAND, A. Victor *et al.* – **Color Atlas of Clinical Hematology: Molecular and Cellular Basis of Disease.** 5ª Ed. John Wiley & Sons, 2019. ISBN 9781119170600.
- HOFFBRAND, A. Victor ; MOSS, Paul A. H. – **Hoffbrand's Essential Haematology.** 7ª Ed. John Wiley & Sons, 2016. ISBN 978-1-118-40867-4.
- JUSUF, N. K. ; PUTRA, I. B. ; SARI, L. – **Differences of Microbiomes Found in Non-Inflammatory and Inflammatory Lesions of Acne Vulgaris.** Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology, 13 (2020) 773-780.
- KIM, Jayoung, *et al.* – **Evaluation of an immunochromatographic assay for the rapid and simultaneous detection of rotavirus and adenovirus in stool samples.** Annals of Laboratory Medicine 34.3 (2014): 216.
- KLEIN, S. *et al.* – **SARS-CoV-2 RNA Extraction Using Magnetic Beads for Rapid Large-Scale Testing by RT-qPCR and RT-LAMP.** Viruses. 12(8) (2020) 863.
- KOPOLRAT, Kulthida Y. *et al.* – **Performance of Mini Parasep® SF stool concentrator kit, Kato-Katz, and formalin-ethyl acetate concentration methods for diagnosis of opisthorchiasis in Northeast Thailand.** Parasites & Vectors, 15(234) (2022).
- LIU, M-B *et al.* – **Diverse Vaginal Microbiomes in Reproductive-Age Women with Vulvovaginal Candidiasis.** PLoS ONE. 8(11) (2013) e79812.
- MAHON, C. R. ; LEHMAN, D. C. ; MANUSELIS, G. – **Textbook of Diagnostic Microbiology.** 5ª Ed. Missouri: Saunders Elsevier, 2015. ISBN 978-0-323-08989-0.
- MEWARA, A. *et al.* – **Diagnostic performance of Mini Parasep® solvent-free fecal parasite concentrator for the diagnosis of intestinal parasitic infections.** Indian Journal of Medical Microbiology, 37(3) (2019) 381-386.
- Ministério da Saúde – **Despacho n.º 242/96, de 13 de agosto.** Diário da República n.º 187/1996, Série II. Lisboa, 1996.

- MURRAY, Patrick R., *et al.* – **Manual of clinical microbiology**. 9ª Ed. Washington, DC: ASM Press, 2007. ISBN 1-55581-371-2.
- MURRAY, Patrick R. ; ROSENTHAL, Ken S. ; PFALLER, Michael A. – **Medical Microbiology**. 8ª Ed. Elsevier, 2016. ISBN 978-0-323-29956-5.
- NADAL® H.pylori Antigen Test**. [Bula]. Moers, Alemanha: nal von minden (2013).
- Oxoid Salmonella Test Kit**. [Bula]. Hampshire, Reino Unido: Oxoid Limited (2016).
- PARK, M.-J. *et al.* – **The relationship between iron parameters and platelet parameters in women with iron deficiency anemia and thrombocytosis**. *Platelets*. 24(5) (2012) 348–351.
- Pastorex™ Staph-Plus**. [Bula]. Marnes-la-Coquette, França: Bio-Rad (2018).
- PERRY, John D. – **A Decade of Development of Chromogenic Culture Media for Clinical Microbiology in an Era of Molecular Diagnostics**. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(2) (2017) 449–479.
- PIVA, E. *et al.* – **Clinical Utility of Reticulocyte Parameters**. *Clinics in Laboratory Medicine*. 35(1) (2015) 133–163.
- SAREEN, R. ; KAPIL, M. ; GUPTA, G. – **Incubation and its effect on Leishman stain**. *Journal of Laboratory Physicians*, 10(3) (2018) 357-361.
- SELL, J. ; DOLAN, B. – **Common Gastrointestinal Infections**. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 45(3) (2018) 519–532.
- SHOKRGOZAR, N.; GOLAFSHAN, H. A. – **Molecular perspective of iron uptake, related diseases, and treatments**. *Blood Research*. 54(1) (2019) 10-16.
- SILVA, Paulo Henrique *et al.* – **Hematologia Laboratorial: Teoria e Procedimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2016. ISBN 978-85-8271-260-3.
- S.S. AGAR**. [Bula]. Marnes-la-Coquette, França: Bio-Rad (2014).
- TILLE, Patricia M. – **Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology**. 14ª Ed. Missouri: Elsevier, 2017. ISBN 978-0-323-35482-0