

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM CONTEXTO PROFISSIONAL NO
LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS DO
HOSPITAL SANTA MARIA MAIOR, EPE (HSMM)**

Relatório de Estágio do Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

Bruno Barbosa Gomes Monteiro Lopes

Orientadores:

Dr.^a Filomena Maria Vinagre Alves Silva Ribeiro Dos Reis

Professora Doutora Ana Sampaio



Vila Real, 2019

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM CONTEXTO PROFISSIONAL NO
LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS DO
HOSPITAL SANTA MARIA MAIOR, EPE (HSMM)**

Relatório de Estágio do Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial 2018/2019

Bruno Barbosa Gomes Monteiro Lopes

Orientadores:

Dr.^a Filomena Maria Vinagre Alves Silva Ribeiro Dos Reis

Professora Doutora Ana Sampaio

Composição do Júri:

Presidente: José Albino Gomes Alves Dias

Primeiro Vogal (Arguente): Maria Cristina Guiomar Antunes

Segundo Vogal (Arguente): Patrícia Alexandra Curado Quintas Dinis Poeta

Terceiro Vogal (Orientador): Filomena Maria Vinagre Alves Silva Ribeiro Dos Reis

Vila Real, 2019

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, representada pelo Reitor **Professor Doutor António Augusto Fontainhas Fernandes**, pela formação que me foi possibilitada durante a minha licenciatura e mestrado.

Ao Hospital Santa Maria Maior, EPE, representado pelo **Dr. António Tadeu da Conceição Constante da Rocha**, Diretor do Serviço de Patologia Clínica, por me ter recebido como estagiário e por possibilitar a realização desta monografia.

À **Dr^a Filomena Maria Vinagre Alves Silva Ribeiro Dos Reis** pela orientação, disponibilidade e acompanhamento ao longo de todo o estágio.

À professora **Doutora Ana Cristina Ramos Sampaio** pela co-orientação, disponibilidade e acompanhamento ao longo de todo este trabalho.

A todos os **Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica** que compõem o Serviço de Patologia Clínica, **Patrícia Araújo, Ana Fernandes, Helena Costa, Helena Rodrigues, Carina Silva, Paula Neves, Ana Santos, Carla Pereira, Bruno Afonso, António Quita, Luísa Reininho**, por todo o apoio, pela forma como me receberam e por todo o conhecimento que me transmitiram ao longo destes 8 meses.

Aos meus amigos, **Ricardo, João, Rui, Sara, Márcia, Nelson, José, Fábio, Ana, Henrique, Rafaela, Pedro, Alda, Elvira, Tiago** que nos últimos anos foram a minha família universitária, sempre presentes nos bons momentos e nos menos bons e independentemente de tudo sempre me apoiaram.

A toda a minha família, em especial à **minha mãe Maria de Conceição Barbosa Gomes**, o meu grande pilar e **ao meu primo João Pedro**, pela disponibilidade e paciência que teve para comigo.

Obrigado por me ajudarem a alcançar todos os meus objetivos, pois sem vocês nada seria possível. Muito obrigado!

RESUMO

As análises laboratoriais têm um grande impacto nas decisões tomadas pelas equipas médicas dado que fornecem dados essenciais para um correto diagnóstico e atribuição de terapêutica.

O presente relatório pretende descrever todas as atividades realizadas durante 8 meses de estágio no Serviço de Patologia Clínica do “Hospital Santa Maria Maior” nas áreas da Microbiologia, Hematologia/Coagulação, Imunoquímica (composta pela Bioquímica, Imunologia e Virologia) e Imuno-Hematologia (banco de sangue).

Nas diversas áreas referidas pretende-se descrever todas as fases que compõem o estudo laboratorial, mais concretamente as metodologias, equipamentos e materiais utilizados na rotina laboratorial diária para o estudo de parâmetros/produtos/analitos, para assim chegar a uma ou mais patologias. Tendo sempre como referência o trabalho do hospital desde o acompanhamento de pacientes do internamento, do serviço de urgência, ao hospital de dia, consultas externas e centros de saúde da região de Barcelos.

Palavras-chave: Patologia clínica; Microbiologia; Hematologia; Coagulação; Bioquímica; Imunologia; Virologia; Medicina transfusional.

ABSTRACT

Laboratory analyses have a great impact on the decisions made by medical teams, since they provide the essential data to a correct diagnosis and choice of therapy.

This report aims to describe all the activities carried out during the 8 months of internship in “Santa Maria Maior Hospital” Clinical Pathology Service in the fields of Microbiology, Hematology/Coagulation, Immunochemistry (composed of Biochemistry, Immunology and Virology) and Immunohematology (blood bank).

In the above referred areas, this report intends to describe all the phases that comprise the laboratory study, namely the methodologies, equipment and materials used, during the daily laboratory routine for the study of all the parameters / products / analytes, in order to arrive at one or more pathologies. These approaches were always referred the hospital base work, i.e. the follow-up of patients, the emergency service, day hospital and health centers in the Barcelos region.

Keywords: Clinical pathology; Microbiology; Hematology; Coagulation; Biochemistry; Immunology; Virology; Transfusion medicine.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO.....	III
ABSTRACT	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS.....	XIII
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1 - CARACTERIZAÇÃO DO SERVIÇO DE PATOLOGIA CLÍNICA	3
1.1 - FASES DO ESTUDO LABORATORIAL	3
1.2 - MATERIAIS PARA COLHEITA	5
1.3 - AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE.....	8
1.4 - POLÍTICA DE RESÍDUOS	9
1.5 - COLABORAÇÕES COM OUTRAS ENTIDADES.....	9
1.5.1 - SISTEMA NACIONAL DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA	10
1.5.2 - PROGRAMA DE PREVENÇÃO E CONTROLO DE INFECÇÕES E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.....	11
1.5.3 - INSTITUTO DE PATOLOGIA E IMUNOLOGIA MOLECULAR DA UNIVERSIDADE DO PORTO	11
CAPÍTULO 2 - MICROBIOLOGIA	13
2.1 - MATERIAIS E METODOLOGIAS.....	13
2.1.1 - MEIOS DE CULTURA.....	13
2.1.2 - TÉCNICAS DE COLORAÇÃO	15
2.1.3 – PROVAS DE IDENTIFICAÇÃO.....	16
2.1.4 - TESTES RÁPIDOS.....	16
2.1.5 - DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS EM HEMOCULTURAS	17
2.1.6 - IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS E TESTES DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS	18
2.2 - PROCESSAMENTO DE PRODUTOS BIOLÓGICOS.....	19
2.2.1 - URINAS.....	19
2.2.2 - LÍQUIDO CEFALO-RAQUIDIANO (LCR).....	20
2.2.3 - LÍQUIDOS DE SEROSAS	22
2.2.4 - LAVADO BRÔNQUICO E LAVADO BRONCO-ALVEOLAR	23
2.2.5 - EXPETORAÇÕES E SECREÇÕES BRÔNQUICAS	24
2.2.6 - HEMOCULTURA	25
2.2.7 - EXSUDADO DA OROFARINGE	26
2.2.8 - EXSUDADO PARANASAL.....	27
2.2.9 - EXSUDADOS OCULARES	28
2.2.10 - PUS DE OUVIDO	29
2.2.11 - EXSUDADOS PURULENTOS	30
2.2.12 - EXSUDADO VAGINAL	31
2.2.13 - ESPERMOCULTURA	32
2.2.14 - FEZES	33
2.2.15 - CATETERES VASCULARES	34
2.2.16 - ZARAGATOIA NASAL.....	35
2.2.17 - ZARAGATOIA RETAL	36

2.3 - ROTINA LABORATORIAL	37
CAPÍTULO 3 - HEMATOLOGIA E COAGULAÇÃO	39
3.1 - MATERIAIS E METODOLOGIAS.....	39
3.1.1 - HEMOGRAMA.....	39
3.1.2 - ESFREGAÇO SANGUÍNEO	40
3.1.3 - PROVAS DE COAGULAÇÃO.....	41
3.2 - PARÂMETROS AVALIADOS	41
3.2.1 - ERITRÓCITOS	41
3.2.2 - RETICULÓCITOS	43
3.2.3 - LEUCÓCITOS	43
3.2.4 - PLAQUETAS.....	45
3.2.5 - VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO ERITROCITÁRIA	46
3.2.6 - COAGULAÇÃO	47
3.2.7 - ATIVIDADE DO D-DÍMERO.....	48
3.3 - ROTINA LABORATORIAL	48
3.3.1 - HEMATOLOGIA.....	48
3.3.2 - COAGULAÇÃO	49
CAPÍTULO 4 - IMUNOQUÍMICA.....	51
4.1 - MATERIAIS E METODOLOGIAS.....	51
4.1.1 - PROTEINOGRAMA POR ELETROFORESE.....	51
4.1.2 - ANÁLISE <i>IN VITRO</i> DE URINA	52
4.1.3 - ANÁLISES FOTOMÉTRICAS E IMUNOENSAIOS	53
4.1.4 - IONOGRAMA POR ELÉTRÓDOS SELETIVOS DE IÕES (ISE)	55
4.1.5 - IMUNOENSAIOS DE MICROPARTÍCULAS	55
4.1.6 - TESTES A ALERGIAS.....	56
4.1.7 - TÉCNICAS MANUAIS	57
4.2 - PARÂMETROS DE ANÁLISE	58
4.2.1 - URINA TIPO II.....	58
4.2.2 - MARCADORES VÍRICOS	62
4.2.3 - MARCADORES TUMORAIS	63
4.2.4 - MARCADORES DE DOENÇAS CONGÉNITAS	64
4.2.5 - MARCADORES DA FUNÇÃO HEPATOBILIAR	65
4.2.6 - MARCADORES DA FUNÇÃO PANCREÁTICA.....	67
4.2.7 - MARCADORES DA FUNÇÃO RENAL.....	67
4.2.8 - MARCADORES DE LESÃO MUSCULAR	67
4.2.9 - MARCADORES CARDÍACOS.....	68
4.2.10 - MONITORIZAÇÃO DA ANEMIA	69
4.2.11 - MONITORIZAÇÃO DO FERRO.....	70
4.2.12 - MONITORIZAÇÃO DE HIDRATOS DE CARBONO	71
4.2.13 - MONITORIZAÇÃO DE LÍPIDOS (PERFIL LIPÍDICO)	72
4.2.14 - METABOLISMO DE PURINAS	72
4.2.15 - METABOLISMO MINERAL E ÓSSEO	73
4.2.16 - MONITORIZAÇÃO DE FÁRMACOS	73
4.2.17 - MONITORIZAÇÃO DA TIROIDE	74
4.3 - ROTINA LABORATORIAL	75
CAPÍTULO 5 - IMUNO-HEMATOLOGIA.....	77

5.1 - PROCEDIMENTOS DE FUNCIONAMENTO.....	77
5.1.1 - REQUISIÇÃO.....	77
5.1.2 - SEGURANÇA DA CADEIA TRANSFUSIONAL.....	78
5.1.3 - CONTROLO DE STOCK.....	79
5.1.4 - SITUAÇÕES DE CARÁCTER EMERGENTE.....	80
5.2 - MATERIAIS E METODOLOGIAS EM MEDICINA TRANSFUSIONAL.....	80
5.2.1 - TÉCNICA EM GEL.....	80
5.2.2 - REAGENTES.....	81
5.3 - ROTINA PRÉ-TRANSFUSIONAL.....	82
5.3.1 - DETERMINAÇÃO DO GRUPO SANGUÍNEO ABO/RH DO RECETOR.....	83
5.3.2 - DETERMINAÇÃO DO FENÓTIPO RH/KELL DO RECETOR.....	85
5.3.3 - PESQUISA DE ANTICORPOS IRREGULARES (PAI) DO RECETOR.....	86
5.3.4 - IDENTIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS IRREGULARES.....	87
5.3.5 - CONFIRMAÇÃO DO GRUPO SANGUÍNEO DO DADOR E PROVA DE COMPATIBILIDADE.....	88
5.4 - CONTROLO DE QUALIDADE.....	89
5.4.1 - CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO.....	89
5.4.2 - CONTROLO DE QUALIDADE EXTERNO.....	90
CONCLUSÕES.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Percurso pré-analítico das amostras no SPC.....	4
Figura 2 - Tubos S-Monovette®	6
Figura 3 - Frascos de hemocultura	6
Figura 4 - Recipientes.....	7
Figura 5 - Tubo para colheita de produtos biológicos.....	7
Figura 6 - a) zaragatoa; b) ansa;.....	8
Figura 7 - Equipamento BACT ALERT® 3D 120.	17
Figura 8 - Processo laboratorial da urina no SPC.	20
Figura 9 - Processo laboratorial do LCR no SPC.	21
Figura 10 - Kit de Pesquisa de Antígenos Capsulares.....	22
Figura 11 - Processo laboratorial dos líquidos de serosas no SPC.....	23
Figura 12 - Processo laboratorial dos lavados brônquico e bronco-alveolar no SPC.	24
Figura 13 - Processo laboratorial das expetorações e secreções brônquicas no SPC.	25
Figura 14 - Processo laboratorial das hemoculturas no SPC.....	26
Figura 15 - Processo laboratorial do exsudado da orofaringe no SPC.....	27
Figura 16 - Processo laboratorial do exsudado paranasal no SPC.	28
Figura 17 - Processo laboratorial dos exsudados oculares no SPC.....	29
Figura 18 - Processo laboratorial do pus de ouvido no SPC.	30
Figura 19 - Processo laboratorial dos exsudados purulentos no SPC.	31
Figura 20 - Processo laboratorial do exsudado vaginal no SPC.	32
Figura 21 - Processo laboratorial da espermocultura no SPC.....	33
Figura 22 - Processo laboratorial do exame bacteriológico das fezes no SPC.	34
Figura 23 - Processo laboratorial dos cateteres vasculares no SPC.	35
Figura 24 - Processo laboratorial da zaragatoa nasal no SPC.....	36
Figura 25 - Processo laboratorial da zaragatoa retal no SPC.....	36
Figura 26 - Lista de trabalho e amostras.....	37
Figura 27 - Conjunto de suspensões com cartas de identificação e testes de suscetibilidade antimicrobiana.....	38
Figura 28 - VITEK® 2 Compact.....	38
Figura 29 - Suporte para determinar a velocidade de sedimentação	47

Figura 30 - UniCel® DxH 600 Coulter® Cellular Analysis System.	49
Figura 31 - Sysmex CA-600 Systems	50
Figura 32 - MINICAP (sistema capilar de eletroforese).	51
Figura 33 - Proteinograma por eletroforese e frações correspondentes	52
Figura 34 - Urisys 2400.	53
Figura 35 - Cobas 6000.	54
Figura 36 - Cobas Integra 400 plus.	54
Figura 37 - Cobas e 411.....	55
Figura 38 - Architect <i>plus i</i> 2000 _{SR}	56
Figura 39 - Unicap 100.....	57
Figura 40 - Lâmina K-Cell utilizada na análise microscópica do sedimento urinário	60
Figura 41 - Morfologia dos cristais urinários	61
Figura 42 - Morfologia dos cilindros	61
Figura 43 - Pulseira transfusional.....	78
Figura 44 - Exemplo de um <i>ID-Card</i> da Bio-Rad para técnica em gel.....	80
Figura 45 - Tipos de aglutinação possíveis de ocorrer	81
Figura 46 - <i>ID-Card</i> “DiaClon ABO/Rh for patients”	84
Figura 47 - <i>ID-Card</i> “Reverse Grouping with Antibody Screening”.	85
Figura 48 - <i>ID-Card</i> “DiaClon RH-subgroups + K”.	86
Figura 49 - <i>ID-Card</i> “LISS/Coombs”	86
Figura 50 - <i>ID-Card</i> “NaCl, Enzyme Test and cold Agglutinins”.	87
Figura 51 - Tabela para identificação de anticorpos	88
Figura 52 - <i>ID-Card</i> “DiaClon Complete Crossmatch”.	89
Figura 53 - Tabela do kit IH-QC Modular System da BioRad	90

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Normas de organização e gestão dos resíduos hospitalares	9
Tabela 2 - Lista de Doenças Transmissíveis de Notificação Obrigatória que devem ser reportadas ao SINAVE.	10
Tabela 3 - Meios de cultura utilizados no laboratório de microbiologia do SPC	14
Tabela 4 - Cartas para identificação de microrganismos (VITEK® 2) utilizadas no laboratório de microbiologia do SPC.	18
Tabela 5 - Cartas para testes de suscetibilidade antimicrobiana (VITEK® 2) utilizadas no laboratório de microbiologia do SPC.	19
Tabela 6 - Agentes etiológicos mais frequentes nas meningites agudas em vários doentes....	21
Tabela 7 - Alterações morfológicas a nível dos eritrócitos e possíveis causas para a sua ocorrência.....	42
Tabela 8 - Alterações dos leucócitos e quadro clínico associado	44
Tabela 9 - Alterações plaquetárias e quadro clínico associado.....	46
Tabela 10 - Parâmetros avaliados no exame de urina tipo II e o seu significado clínico	58
Tabela 11 - Marcadores tumorais analisados no SPC	63
Tabela 12 - Resultado do exame da Rubéola e o seu significado clínico.....	64
Tabela 13 - Relação dos parâmetros da monitorização do ferro no sangue com diversas doenças	71

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

aPTT - tempo de tromboplastina parcial ativada

AEQ - Avaliação Externa de Qualidade

ASIS - Aplicação de Sistema de Informação de Sangue

ATB - Antibiograma

BHI - Infusão Cérebro Coração “Brain-Heart Infusion”

CAM – Gelose Campylosel “Campylosel agar”

CLED - Cistina Lactose Eletrólito Deficiente “Cystine lactose electrolyte deficient”

DGS - Direção-Geral da Saúde

DQS - Departamento da Qualidade na Saúde

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético “Ethylenediaminetetraacetic acid”

GChoco - Gelose de Chocolate

GS - Gelose de sangue

IgG - imunoglobulina G

IgM - imunoglobulina M

IPATIMUP - Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto

IPST - Instituto Português do Sangue e Transplantação

ISE - elétrodos seletivos de iões “Ion-selective electrode”

LCR - Líquido Céfalo-raquidiano

Mac - “MacConkey”

MRSA - *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina “Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*”

PPCIRA - Programa de Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos

PT - tempo de protrombina

SINAVE - Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica

SNS - Serviço Nacional de Saúde

SPC - Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Santa Maria Maior

SS - *Salmonella*, *Singella*

TSDT - Técnico Superior de Diagnóstico e Terapêutica

UK NEQAS - United Kingdom National External Quality Assessment Service

VIH - Vírus da imunodeficiência humana

INTRODUÇÃO

O presente relatório pretende descrever todas as atividades realizadas durante 8 meses de estágio curricular e constitui o elemento de avaliação final do Mestrado de Biologia Clínica Laboratorial (MBLC) ministrado pela Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD).

O estágio foi realizado no laboratório de Patologia Clínica do Hospital Santa Maria Maior, EPE, um serviço acreditado pelo Departamento da Qualidade na Saúde (DQS) da Direção-Geral da Saúde (DGS) (@QREDITA), reconhecendo a alta qualidade do seu serviço.

Os laboratórios clínicos têm um grande impacto nas decisões tomadas pelas equipas médicas, pois as análises laboratoriais, fornecem dados essenciais para um correto diagnóstico e atribuição de terapêutica. Para isso, é de extrema importância assegurar um elevado nível de qualidade no laboratório, de forma, a transmitir aos médicos o máximo de confiança na tomada de decisões.

Os principais objetivos deste estágio são: adquirir experiência e conhecimento prático nas áreas da Microbiologia, Hematologia/Coagulação, Imunoquímica (composta pela Bioquímica, Imunologia e Virologia) e Imuno-Hematologia (banco de sangue); estabelecer contacto com equipamentos e técnicas utilizadas no processamento de amostras biológicas provenientes de pacientes do internamento, serviço de urgência, hospital de dia, consulta externa e centros de saúde da região de Barcelos; e integração na rotina laboratorial de um laboratório hospitalar.

De forma a documentar este estágio dividiu-se este relatório da seguinte forma:

No 1º capítulo é feita uma breve caracterização do Serviço de Patologia Clínica do “Hospital de Santa Maria Maior”. No 2º capítulo é descrito o serviço do laboratório de Microbiologia, dando ênfase aos materiais e metodologias, esquematizando o processo de análise dos produtos biológicos e descrevendo a rotina diária. No 3º capítulo é explicado o serviço do laboratório de Hematologia e Coagulação incidindo nas metodologias e parâmetros obtidos e a sua avaliação, bem como a rotina laboratorial. No 4º capítulo é mencionado o serviço do laboratório de Imunoquímica nas suas metodologias e análises relacionando os resultados com o seu significado clínico. No 5º capítulo é referido o serviço de Imuno-Hematologia, mais concretamente a rotina pré-transfusional expondo toda a cadeia de procedimentos e metodologias associadas a esta área.

CAPÍTULO 1 - CARACTERIZAÇÃO DO SERVIÇO DE PATOLOGIA CLÍNICA

O Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Santa Maria Maior (SPC) desenvolve a sua atividade nas áreas de Hematologia/Coagulação, Bioquímica/Imunoquímica, Microbiologia e assegura também a medicina transfusional do serviço de Imunohemoterapia.

O SPC assegura a realização dos exames laboratoriais necessários ao diagnóstico laboratorial e o acompanhamento dos pacientes do serviço de urgência, do hospital de dia, do internamento, das consultas externas e de todos os centros de saúde da região de Barcelos/Esposende. Além disso, procura garantir um elevado nível de qualidade nas suas atividades para bem servir os pacientes e todos os profissionais que dependem deste serviço, através de rigorosos procedimentos de controlo de qualidade internos e externos.

De seguida são apresentadas as fases que compõem o estudo laboratorial, os materiais utilizados para a colheita, os programas de avaliação de qualidade externa, a política de resíduos e as colaborações mais relevantes com outras entidades.

1.1 - FASES DO ESTUDO LABORATORIAL

A realização de um exame laboratorial passa por três fases diferentes: a fase pré-analítica, fase-analítica e a fase pós-analítica.

A fase pré-analítica (1ª fase) compreende tudo o que ocorre entre a requisição do exame, a colheita, a correta identificação e rotulagem dos recipientes de colheita, o transporte da amostra biológica e a sua receção no laboratório até estar pronta para a análise [1]. É nesta fase que ocorre o maior número de não-conformidades (por exemplo, recipiente a verter parte da amostra) e erros laboratoriais, dada toda a sua complexidade.

Para evitar ao máximo o erro, deve ser desenvolvido um percurso pré-analítico bem definido. Na figura 1 encontra-se esquematizado o percurso pré-analítico no SPC.

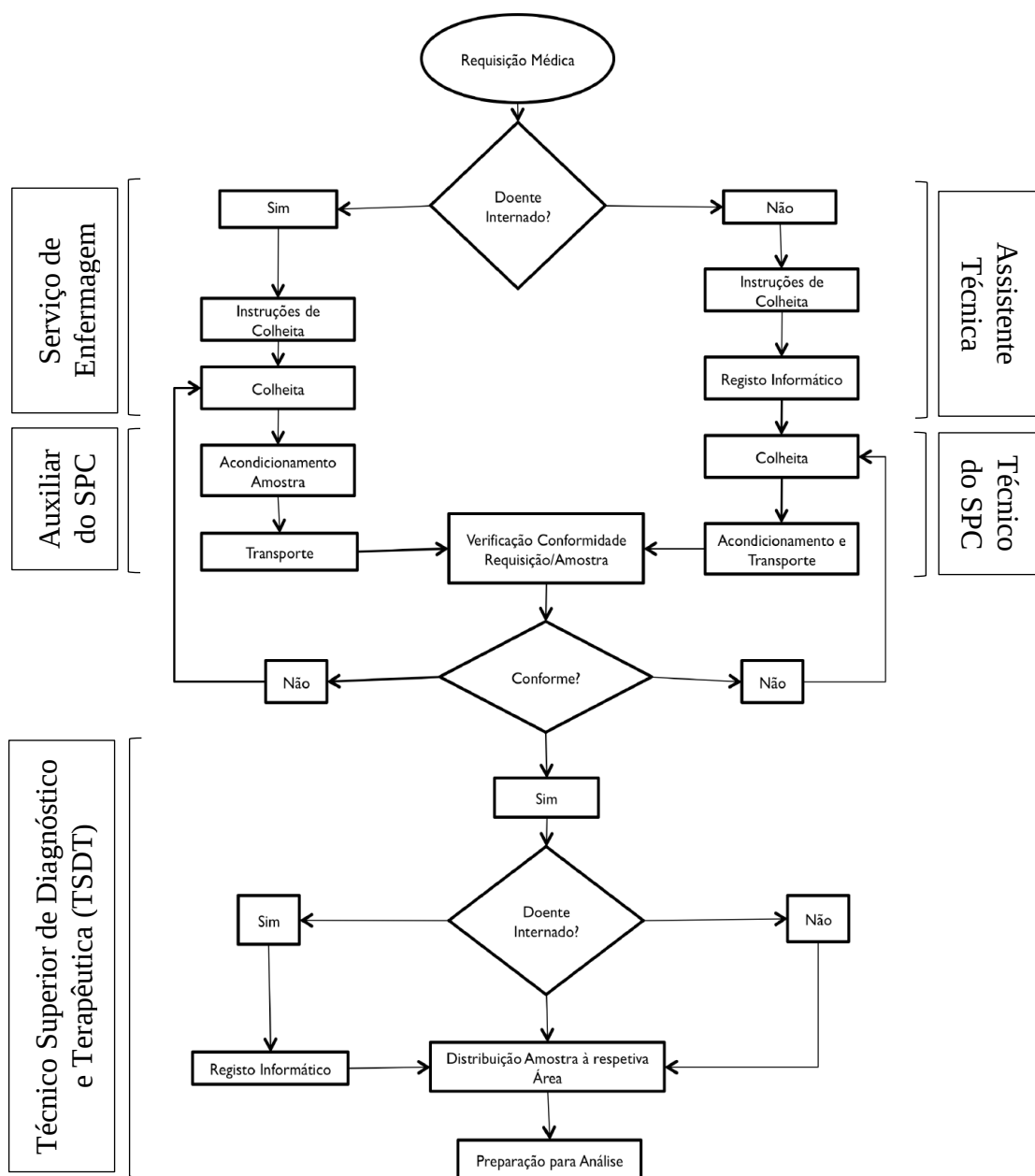


Figura 1 - Percurso pré-analítico das amostras no SPC (fonte: Manual de Qualidade do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Santa Maria Maior).

A fase analítica (2ª fase) corresponde ao exame laboratorial da amostra, seja manualmente ou através de equipamentos. Nesta fase devem estar perfeitamente clarificadas as regras e práticas para todos os procedimentos, equipamentos e reagentes necessários à realização dos vários exames laboratoriais, que devem estar disponíveis e de fácil acesso a todos os Técnicos [1]. Cada laboratório é da responsabilidade de um TSDT, em regime de rotações semanais.

A fase pós-analítica (3ª fase), de uma forma sucinta, corresponde à validação dos resultados e termina com a emissão do parecer técnico a nível informático, com todos os dados originais, valores de referência e comentários [1].

1.2 - MATERIAIS PARA COLHEITA

Em relação aos materiais para colheita existem diferentes recipientes e tubos com características diferentes consoante as exigências das análises laboratoriais a que se destinam. De seguida descrevem-se os recipientes e a sua utilização no SPC:

- **S-Monovette® 7,5ml Soro-Gel** - Tubo seco com gel ativador de coagulação (figura 2-a) utilizado na área de imunoquímica. Antes da sua entrada no equipamento é centrifugado a 3500 rotações por minuto, durante 10 minutos, e quando necessário deve-se remover a fibrina se esta estiver presente. Também pode ser usado para análise de “urina 24 horas”.
- **S-Monovette® 7,5ml Li-Hep** - Tubo de heparina-lítio (figura 2-b) utilizado apenas na área da imunoquímica. Este anticoagulante (heparina-lítio) impede a formação de fibrina na superfície do plasma. A amostra é centrifugada a 3500 rotações por minuto, durante 10 minutos.
- **S-Monovette® 4,3ml Citrato 9NC** - Tubo de citrato trissódico (figura 2-c) utilizado nas provas de coagulação. É centrifugado a 3600 rotações por minuto, durante 15 minutos.
- **S-Monovette® 4ml K₃ EDTA** - Tubo de EDTA K₃ (figura 2-d) utilizado na hematologia para a determinação do hemograma nas provas pré-transfusionais e para a determinação da amónia na bioquímica (centrifugação a 3500 rotações por minuto, durante 10 minutos).
- **S-Sedivette® 3.5ml Citrato 4NC** - Tubo de citrato trissódico (figura 2-e) utilizado na hematologia para determinar a velocidade de sedimentação dos eritrócitos após 60 minutos.

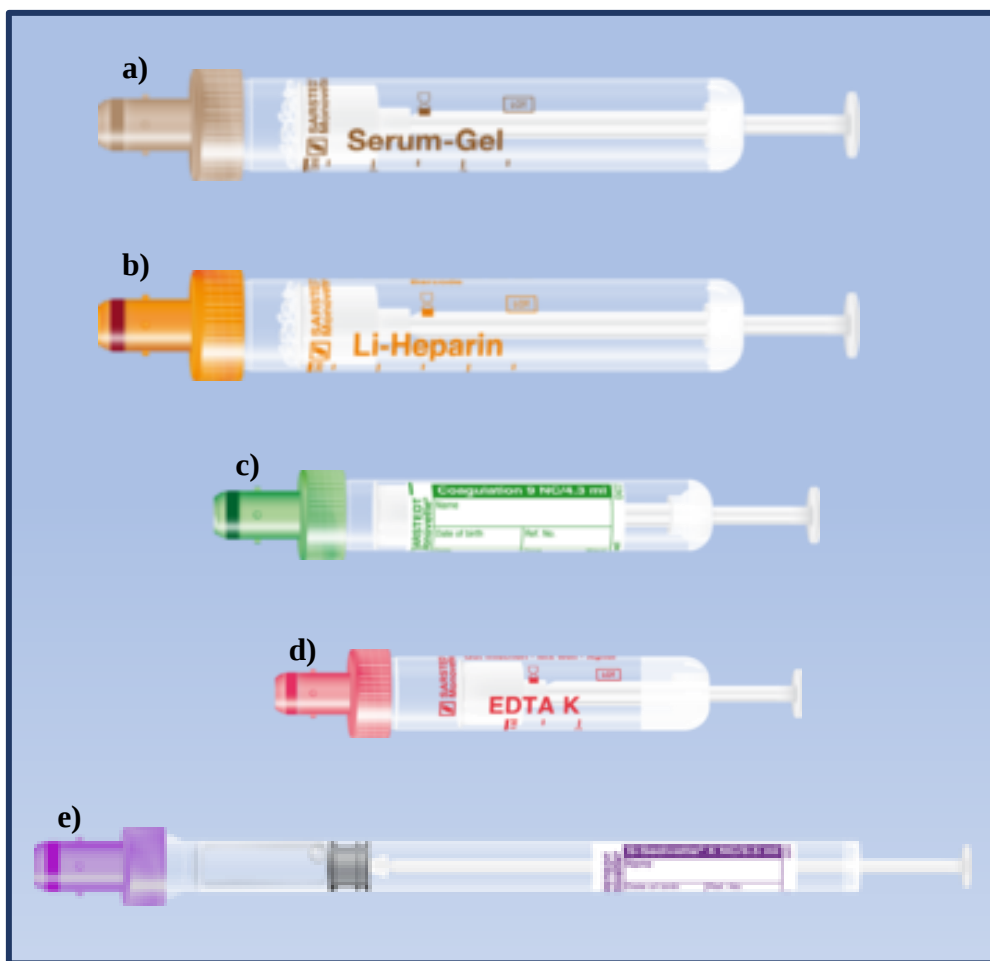


Figura 2 - Tubos S-Monovette® - a) 7,5ml Soro-Gel; b) 7,5ml Li-Hep; c) 4,3ml Citrato 9NC; d) 4ml K3 EDTA; e) 3.5ml Citrato 4NC; (fontes: <https://www.sarstedt.com/pt/produtos/diagnostico/sangue-venoso/s-monovetter/>, <https://www.sarstedt.com/pt/produtos/diagnostico/hemossedimentacao/sistemas-de-coleta-de-sangue/>).

- **Frascos de hemocultura BACT/ALERT® FA e PF** (figura 3) - utilizado na microbiologia para a cultura de sangue em meio específico no equipamento BACT/ALERT® 3D 120.



Figura 3 - Frascos de hemocultura (fonte: <https://www.biomerieux-usa.com/bact-alert/culture-media>).

- **Recipiente para recolha de “urina 24 horas”** (figura 4-a) - utilizado na imunoquímica para a análise de “urina 24 horas”. Qualquer recipiente com tampa hermética e com capacidade suficiente para recolher toda a urina durante 24 horas pode ser utilizado, e se possível deve conter marcas para medição do volume.
- **Recipiente para colheita de urina** (figura 4-b) - utilizado para recolha de urina, destinada a análise bioquímica e bacteriológica.
- **Recipiente para colheita de fezes** (figura 4-c) - utilizado na microbiologia para coprocultura, para a pesquisa de sangue oculto e para a deteção de Rotavírus.
- **Recipiente para colheita de produtos biológicos** (figura 4-d) - utilizado para a colheita de: expetorações, secreções brônquicas, etc., destinados à área de microbiologia.

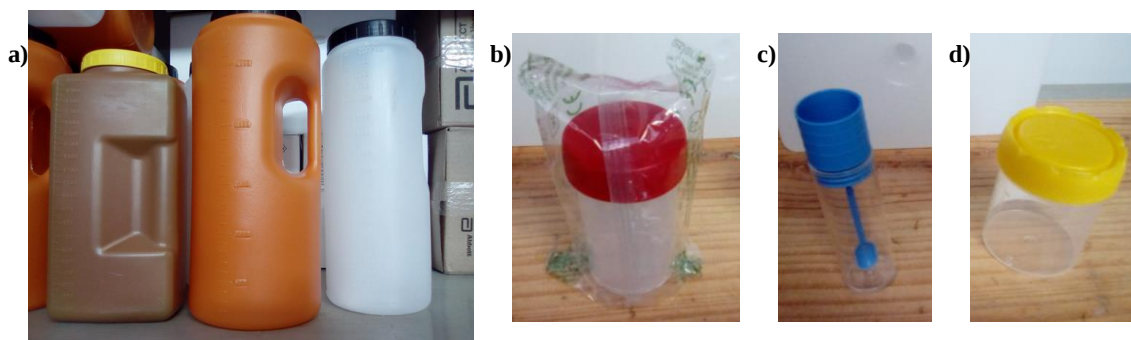


Figura 4 – Recipientes - a) para recolha de “urina 24 horas”; b) para colheita de urina; c) para colheita de fezes; d) para colheita de produtos biológicos.

- **Tubo para colheita de produtos biológicos** (figura 5) - utilizado para a colheita de: líquido céfalo-raquidiano, líquido ascítico, entre outros líquidos orgânicos, destinados à área de microbiologia.



Figura 5 - Tubo para colheita de produtos biológicos (fonte: <https://www.sarstedt.com/pt/produtos/laboratorio/tubos-de-reagente-e-de-centrifuga/tubos/product/62.554.001/>).

- **Zaragatoa** (figura 6-a) - utilizada na microbiologia para recolha de produtos biológicos purulentos.
- **Ansa** (figura 6-b) - utilizada na microbiologia para semear produtos biológicos em meios de cultura.



Figura 6 – a) zaragatoa; b) ansa; (fonte: http://www.esteriplas.net/product_info.php?products_id=681; <https://www.hiberniamedical.ie/product/gamma-sterile-inoculation-loop-with-needle-2/>).

1.3 - AVALIAÇÃO DA QUALIDADE

Grande parte das decisões médicas, são tomadas com base nos resultados dos exames laboratoriais. Por essa razão os médicos e os pacientes necessitam ter confiança nos resultados fornecidos pelos laboratórios clínicos. Para isso, todos laboratórios que compõem o SPC, são diariamente submetidos a uma avaliação interna da qualidade e participam em programas de avaliação externa da qualidade (AEQ).

O SPC participa nomeadamente nas avaliações conduzidas pelo “*United Kingdom National External Quality Assessment Service*” (UK NEQAS) e pelo Instituto Ricardo Jorge. Estes enviam vários tipos de amostras biológicas que são processadas pelos equipamentos e metodologias utilizadas em todos laboratórios que compõem o SPC. Os resultados destas análises são enviados para a instituição e mais tarde são comparados com os resultados dos outros participantes, deste modo a AQE tem como objetivo avaliar os resultados da mesma amostra executadas em diferentes laboratórios, permitindo assim determinar a exatidão dos métodos utilizados.

1.4 - POLÍTICA DE RESÍDUOS

A política implementada de resíduos no “Hospital de Santa Maria Maior”, segue as normas nacionais de organização e gestão dos resíduos hospitalares, de acordo com o despacho n.º 242/96, 2ª série do Diário da República n.º 187 de 13 de Agosto. A tabela 1 resume esta norma em relação aos grupos de resíduos.

Tabela 1 - Normas de organização e gestão dos resíduos hospitalares [2]

Resíduos não perigosos		
Grupo I - Resíduos provenientes de serviços gerais como gabinetes, salas de reunião e de convívio, instalações sanitárias, higiene pessoal, vestuários; - Resíduos provenientes de atividades de alimentação, resultantes da sua confeção e consumo incluindo restos alimentares não incluídos no grupo III.	Grupo II - Embalagens vazias de medicamentos, produtos químicos, ou outros produtos de uso clínico com exceção dos incluídos no grupo III e no grupo IV; - Material de proteção individual - máscaras, manguitos, aventais, luvas, botas, toucas - utilizados nos serviços gerais, com a exceção do utilizado na recolha de resíduos.	
Resíduos perigosos		
Grupo III - Amostras biológicas (tecidos, sangue, soros, etc.), seringas não acopladas; - Materiais contaminados ou com vestígios de sangue: compressas, algodões, resguardos descartáveis e papel protetor de bancada, tubos de colheita, pipetas ou micropipetas; - Placas de Petri ou outros recipientes de crescimento de culturas.	Grupo IV - Resíduos cortantes e perfurantes: agulhas, bisturis, lâminas, lamelas, etc.;	Resíduos Especiais Perigosos - Produtos químicos: solventes halogenados ou não, soluções ácidas ou básicas, sais e soluções com cianetos; - Reagentes não identificados ou obsoletos: outros resíduos sujeitos a recolha pontual (por exemplo: componentes sanguíneos, cuja validade expirou).

1.5 - COLABORAÇÕES COM OUTRAS ENTIDADES

Por forma a garantir a saúde pública na região de Barcelos, o “Hospital de Santa Maria Maior” e o SPC colaboram com outras entidades em programas de prevenção e controlo de várias doenças e avaliação da sua patogenicidade.

1.5.1 - SISTEMA NACIONAL DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

O Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica (SINAVE) é um sistema de vigilância, da responsabilidade da Direção Geral de Saúde (DGS). O seu objetivo é recolher, atualizar e divulgar informações relacionadas com doenças transmissíveis entre outros potenciais riscos para a saúde pública, além disso, em situações de emergência este sistema é responsável pela preparação de planos de contingência [3]. É importante assim referir que o “Hospital de Santa Maria Maior”, do qual o SPC faz parte, participa e reporta ao SINAVE “Doenças Transmissíveis de Notificação Obrigatória”. A lista destas doenças é apresentada na tabela 2.

Tabela 2 - Lista de Doenças Transmissíveis de Notificação Obrigatória que devem ser reportadas ao SINAVE.

▪ Botulismo ▪ Brucelose ▪ Campilobacteriose ▪ Cólera ▪ Criptosporidiose ▪ Dengue ▪ Difteria ▪ Doença de <i>Creutzfeldt – Jakob</i> (DCJ) ▪ Doença de <i>Creutzfeldt – Jakob variante</i> (vDCJ) ▪ Doença de Hansen (Lepra) ▪ Doença de Lyme (Borreliose) ▪ Doença dos Legionários ▪ Doença Invasiva Meningocócica ▪ Doença Invasiva Pneumocócica ▪ Doença Invasiva por <i>Haemophilus influenzae</i> ▪ Ébola ▪ Equinococose / Hidatidose ▪ Febre Amarela ▪ Febre Escaro-Nodular (Rickettsiose) ▪ Febre Q ▪ Febre Tifoide e Febre Paratifoide ▪ Febres hemorrágicas virais e febres por arbovirus ▪ Giardíase ▪ Gonorreia ▪ Gripe Não Sazonal ▪ Hepatite A, B, C e E ▪ Infecção pelo novo Coronavírus (MERS-CoV) ▪ Infecção por <i>Bacillus anthracis</i> ▪ Infecção por <i>Chlamydia trachomatis</i>, incluindo Linfogranuloma venéreo	▪ Infecção por <i>Escherichia coli</i> produtora de Toxina Shiga ou Vero (Stec/Vtec) ▪ Infecção por vírus do Nilo Ocidental ▪ Infecção por Vírus ZIKA ▪ Leishmaniose Visceral ▪ Leptospirose ▪ Listeriose ▪ Malária ▪ Paralisia Flácida Aguda ▪ Parotidite Epidémica ▪ Peste ▪ Poliomielite Aguda ▪ Raiva ▪ Rubéola Congénita ▪ Rubéola, excluindo congénita ▪ Salmoneloses não Typhi e não Paratyphi ▪ Sarampo ▪ Sífilis ▪ Síndrome Respiratória Aguda – SARS ▪ Tétano ▪ Tosse Convulsa ▪ Toxoplasmose Congénita ▪ Triquinelose ▪ Tuberculose ▪ Tularémia ▪ Variola ▪ VIH (inf. pelo vírus da imunodeficiência humana) / SIDA ▪ Yersiniose
--	---

1.5.2 - PROGRAMA DE PREVENÇÃO E CONTROLO DE INFEÇÕES E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

As infeções associadas a cuidados de saúde e o aumento da resistência dos microrganismos aos antimicrobianos são problemas intimamente relacionados e de importância crescente à escala mundial, sendo que nenhum país e nenhuma unidade de saúde pode ignorar as implicações destas infeções e o seu impacto nos utentes, nas unidades de saúde e na comunidade, como o aumento da morbilidade e a mortalidade, prolongamento do tempo de internamento e aumento de custos em saúde [4].

Dada a relevância deste problema, em 2013 pelo despacho n.º 2902/2013, é criado o Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos (PPCIRA) e, pelo despacho n.º 15423/2013, foram criados os Grupos de Coordenação Regional do PPCIRA em Administrações Regionais de Saúde, bem como os Grupos de Coordenação Local do PPCIRA em cada uma das unidades prestadoras de cuidados de saúde primários, hospitalares e continuados, integradas no Serviço Nacional de Saúde (SNS) [4].

No Hospital Santa Maria Maior o laboratório de Microbiologia participa com o Grupo de Coordenação Local do PPCIRA, no qual a Dr.ª Filomena Reis faz parte, na gestão do Plano Operacional de Prevenção e Controlo de Infeção e de Resistência aos Antimicrobianos.

1.5.3 - INSTITUTO DE PATOLOGIA E IMUNOLOGIA MOLECULAR DA UNIVERSIDADE DO PORTO

O Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP), é uma associação privada de utilidade pública que participa em vários projetos de investigação, diagnóstico entre outros. Um dos que se destaca é o estudo de fragmentos de DNA circulante livre através de biópsia líquida de fluidos corporais, nomeadamente sangue periférico. O estudo de biomarcadores moleculares através da biópsia líquida, surge como um método complementar ou alternativo à biópsia cirúrgica, servindo como uma ferramenta de acompanhamento em tempo real da dinâmica do tumor [5].

Deste modo, e dada a sua relevância clínica, o SPC colabora com o IPATIMUP na colheita, manuseamento e o envio de amostras de sangue em tubos de preparação de plasma, seguindo um protocolo validado pelos mesmos.

CAPÍTULO 2 - MICROBIOLOGIA

O estágio na área de Microbiologia decorreu de 1 de Outubro de 2018 a 9 de Novembro de 2018, sobre a coordenação da Dr.^a Filomena Reis e da Técnica Superior de Diagnóstico e Terapêutica (TSDT) Patrícia Araújo.

Proporcionou a aquisição de conhecimento a nível das metodologias adequadas ao crescimento e isolamento de microrganismos; à identificação dos microbianos isolados e à determinação do perfil de suscetibilidade a diversos antimicrobianos.

Neste capítulo são descritos os materiais, reagentes, métodos e equipamentos utilizados no processamento de produtos biológicos no laboratório de Microbiologia, bem como a rotina laboratorial.

2.1 - MATERIAIS E METODOLOGIAS

Para a execução dos variados exames de microbiologia, o laboratório deve estar devidamente provido de equipamentos, materiais e reagentes. De seguida serão abordados os materiais e as metodologias mais importantes no desenvolvimento, isolamento e identificação de microrganismos, passando também pela determinação do antimicrobiano mais eficiente.

2.1.1 - MEIOS DE CULTURA

O meio de cultura é essencial para o desenvolvimento dos microrganismos, este contém nutrientes e especificidades físicas necessárias ao crescimento microbiano. Os meios de cultura podem ser categorizados como: não-seletivo (normalmente enriquecido, permitindo o crescimento da maioria das bactérias); seletivo (suprime o crescimento de alguns microrganismo, permitindo o crescimento de outros); diferencial (permite o reconhecimento de diferentes bactérias com base na cor da sua colónia).

A tabela 3 descreve os meios de cultura da BioMérieux utilizados no SPC.

Tabela 3 - Meios de cultura utilizados no laboratório de microbiologia do SPC [6-21].

Meio	Descrição
BHI (Brain-Heart Infusion)	Meio não seletivo. Caldo composto por uma base nutritiva enriquecida, adaptado ao crescimento de microrganismos exigentes.
Rappaport	Meio que se destina ao enriquecimento de <i>Salmonella</i> a partir das fezes.
Lowenstein-Jensen	Meio diferencial enriquecido que se destina à cultura das micobactérias.
Schaedler + vitamina K3	Caldo que está especialmente adaptado ao crescimento de microrganismos anaeróbios.
Gelose de Esculina	Meio que se destina à deteção da hidrólise da esculina (os compostos libertos reagem com os sais de ferro dando assim uma cor negra ao meio), permitindo assim a diferenciação presuntiva das bactérias como enterococos.
GS (Gelose de Sangue)	Meio não seletivo adicionado com 5% de sangue de ovelhas, tornando o meio muito nutritivo para o crescimento da maioria das espécies bacterianas.
GChoco (Gelose de Chocolate)	Meio enriquecido com PolyVitex, não seletivo que favorece o crescimento de estirpes exigentes como a <i>Neisseria</i> spp. e <i>Haemophilus</i> spp.
CLED (“Cystine lactose electrolyte deficiente”)	Meio não seletivo, diferencial, a deficiência de eletrólitos inibe o “swarming” dos <i>Proteus</i> spp. já a presença de lactose permite diferenciar as colónias fermentadoras (lactose +), alterando para cor amarela devido à acidificação do meio, das não-fermentadoras (lactose -), alterando para cores verdes, azuis ou incolores.
Mac (MacConkey)	Meio seletivo e diferencial para isolamento de bacilos Gram negativo distinguindo fermentadores de lactose (lactose + colónias vermelhas) e não fermentadores (lactose – colónias incolores ou beges) (Enterobacteriaceas, <i>Pseudomonas</i> spp. etc.).
SS (Salmonela Singela)	Meio seletivo e diferencial de isolamento para <i>Salmonella</i> spp. e <i>Shigella</i> spp. A presença de sais de ferro permite a deteção das estirpes produtoras de H ₂ S (colónias com centro negro).
XLD (Xylose Lysine Deoxycholate)	Meio seletivo e diferencial de isolamento para <i>Salmonella</i> spp. e <i>Shigella</i> spp. Permite a deteção de estirpes que possuem descarboxilase (originam colónias vermelhas), que produzem H ₂ S (colónias com centro negro) e estirpes que fermentam açúcares (colónias amarelas ou laranjas).
Sabouraud	Meio que por possuir peptonas e glucose, favorece o desenvolvimento de espécies fúngicas.
CAM (Gelose Campylosel)	Meio seletivo para o isolamento de <i>Campylobacter</i> spp. a partir de fezes. Possui sangue de carneiro que facilita o crescimento.
YER (Gelose Yersinia)	Meio seletivo e diferencial para o isolamento de <i>Yersinia</i> . Devido à presença no meio de manitol e vermelho neutro, é possível a diferenciação das colónias pela coloração (colónias rosa escuro a vermelhas).
MRSA	Meio cromogénico que permite uma identificação direta e definitiva do <i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina (MRSA).

2.1.2 - TÉCNICAS DE COLORAÇÃO

A observação microscópica de preparações coradas permite determinar de forma precisa as características morfológicas das bactérias (forma e afinidade para os corantes) [6].

No SPC são utilizadas as técnicas de coloração de Gram e de Kinyoun.

2.1.2.1 - COLORAÇÃO DE GRAM

A coloração de Gram é um método de coloração, de larguíssima aplicação, que permite dividir as bactérias em dois grandes grupos: Gram positivas e Gram negativas [22].

Certas bactérias quando expostas ao cristal de violeta, e seguidamente pelo iodo, fixam o corante de tal modo que resistem à descoloração por um descorante (álcool ou acetona). A estas bactérias dá-se o nome de bactérias Gram positivo, e coram de violeta escuro [22].

Outras bactérias ficam descoradas quando é aplicado o descorante, dando-se o nome de bactérias Gram negativo. Para que estas se possam ver mais facilmente quando observadas ao microscópio, é necessário utilizar um segundo corante (corante de contraste), geralmente vermelho (safranina ou fucsina) [22].

2.1.2.2 - COLORAÇÃO DE KINYOUN

Método de coloração utilizado para identificar a presença de micobactérias em amostras clínicas ou em colónias (muito utilizado no diagnóstico de tuberculose). Este método baseia-se no fato de as micobactérias conterem lípidos de longa cadeia chamados ácidos micólicos nas suas paredes, conferindo hidrofobicidade à parede celular [23].

A coloração de Kinyoun é uma alternativa melhorada ao uso da coloração de Ziehl-Neelsen, na qual não é necessário o aquecimento da lâmina para liquidificar os ácidos micólicos. A fucsina da coloração de Kinyoun é um corante vermelho que contém fenol, permitindo a solubilização dos lípidos ajudando assim a penetração do corante na parede das micobactérias. Após a coloração com fucsina, a lâmina é coberta com um forte descolorante (mistura de álcool-ácido).

Assim, os microrganismos que não têm na parede ácidos micólicos libertam o corante ficando incolores, já as micobactérias ficam vermelhas. Por fim, os microrganismos que perderam a cor são corados com azul-de-metileno (corante de contraste), permitindo assim diferenciar as micobactérias das restantes [23].

2.1.3 – PROVAS DE IDENTIFICAÇÃO

De forma a determinar o género bacteriológico de alguns tipos de bactérias, são efetuadas duas provas baseadas em características metabólicas. No laboratório de microbiologia do SPC são feitas as seguintes provas [6]:

- **Catálase** - prova cujo princípio baseia-se na reação de decomposição do peróxido de hidrogénio quando este é exposto à enzima catálase. Esta enzima encontra-se presente em muitos organismos, incluindo algumas bactérias. Quando uma colónia de uma bactéria dita catálase positiva é colocada em peróxido de hidrogénio, ocorre a formação de bolhas de oxigénio, visto que, a decomposição da molécula origina duas moléculas de H₂O e uma de O₂;
- **Coagulase** - é uma enzima produzida principalmente pelas estirpes de *Staphylococcus aureus*, sendo que existem duas formas desta enzima, uma ligada à parede da bactéria (“*clumping factor*”) enquanto que outra é libertada pela bactéria sob a forma “livre”. No SPC a prova para a deteção desta enzima é feita por meio de um teste de aglutinação que além de detetar o “*clumping factor*”, deteta também a proteína A e polissacarídeos capsulares de *Staphylococcus aureus* [24].

2.1.4 - TESTES RÁPIDOS

Para uma rápida atuação clínica a um dado problema de saúde que afeta um paciente, é necessário ter à disposição testes rápidos que permitam determinar, em alguns minutos, a origem do problema.

Os testes rápidos frequentemente efetuados na microbiologia são:

- Pesquisa de *Legionella pneumophila* - método imunocromatográfico para a deteção qualitativa do antígeno (serogrupo 1) da *L. pneumophila* em amostras de urina de pacientes com suspeita de pneumonia [25];
- Pesquisa de *Streptococcus pneumoniae* - imunoensaio rápido para a deteção qualitativa de antígenos de *S. pneumoniae* em urinas e no Líquido Céfalorraquidiano (LCR) de pacientes com suspeita de meningite [26];

Também são frequentemente efetuados outros testes rápidos, tais como:

- Pesquisa de Sangue Oculto - método imunocromatográfico no qual apenas é reconhecida a hemoglobina humana (através da reação a anticorpos específicos) nas fezes [27];
- Pesquisa de Rotavírus - teste rápido para a deteção de Rotavírus em fezes humanas [28];
- Pesquisa de Adenovírus - teste rápido para a deteção de Adenovírus em secreções nasofaríngeas [29];
- Pesquisa do Vírus sincincial Respiratório - teste rápido para a deteção do Vírus sincincial Respiratório em secreções nasofaríngeas [30].

2.1.5 - DETEÇÃO DE MICRORGANISMOS EM HEMOCULTURAS

A deteção de microrganismos em hemoculturas (amostra de sangue em meio de cultura específico) é efetuada pelo equipamento BACT ALERT® 3D 120 (Figura 7). É um sistema de teste totalmente automatizado capaz de incubar, agitar e monitorizar de forma contínua os meios inoculados com produtos de pacientes com suspeita de bacteriemia e fungemia [31].



Figura 7 - Equipamento BACT ALERT® 3D 120.

As amostras de sangue são inoculadas em frascos de cultura descartáveis, que contêm um sensor de emulsão líquida no fundo sendo este monitorizado continuamente utilizando foto-detetores de estado sólido. O crescimento bacteriano leva a alterações do CO₂ e pH do meio evidenciados pela mudança de cor no sensor. Esta mudança de cor é medida automaticamente recorrendo a um LED que projeta luz sobre o sensor sendo esta refletida e medida por um foto-detector, quanto mais clara for a cor do sensor mais luz será refletida [31].

2.1.6 - IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS E TESTES DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

A crescente resistência dos microrganismos a agentes antimicrobianos, tem sido um dos grandes desafios na área da saúde. Por esse motivo, os testes de identificação microbiana, juntamente com os testes de suscetibilidade a antimicrobianos, são fundamentais para fornecer informações que permitam respostas clínicas direcionadas e melhores resultados para o cuidado ao paciente [32].

No SPC utiliza-se um equipamento automático para identificação dos microrganismos e para efetuar testes de suscetibilidade a antimicrobianos chamado VITEK® 2 Compact. Este equipamento permite identificar qual o microrganismo isolado e quais são os antimicrobianos mais eficazes. Para isso, utiliza cartas de identificação e cartas para testes de suscetibilidade antimicrobiana e uma suspensão em solução salina do microrganismo isolado. A suspensão tem de ser efetuada a partir de uma colônia pura.

As cartas de identificação VITEK® 2 (Tabela 4) permitem testar e identificar, com facilidade e segurança, uma grande variedade de microrganismos clinicamente relevantes e proporcionar resultados rápidos e precisos.

Tabela 4 - Cartas para identificação de microrganismos (VITEK® 2) utilizadas no laboratório de microbiologia do SPC.

Cartas de identificação	Indicado para:
VITEK® 2 YST ID card	Identificação de Fungos.
VITEK® 2 GN ID card	Identificação de bacilos Gram-negativos fermentadores e não fermentadores.
VITEK® 2 GP ID card	Identificação de bactérias Gram-positivas.
VITEK® 2 NH ID card	Identificação para <i>Neisseria</i> spp., <i>Haemophilus</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. e outros microrganismos de crescimento exigente.

As cartas para testes de suscetibilidade antimicrobiana VITEK[®] 2 (Tabela 5) proporcionam dados relativos à resistência de um microrganismo específico em relação a um ou mais agentes antimicrobianos, e assim inferir quais os indicados a utilizar de modo garantir o sucesso do tratamento.

Tabela 5 - Cartas para testes de suscetibilidade antimicrobiana (VITEK[®] 2) utilizadas no laboratório de microbiologia do SPC.

Cartas para testes de suscetibilidade antimicrobiana	Indicação:
VITEK [®] 2 AST-ST03	<i>Streptococcus</i> spp.
VITEK [®] 2 AST-P648	<i>Staphylococcus</i> spp.
VITEK [®] 2 AST-P586	<i>Enterococcus</i> spp.
VITEK [®] 2 AST-N215	Bacilos Gram-negativos que não fermentadores da lactose
VITEK [®] 2 AST-N248	Bacilos Gram-negativos fermentadores da lactose
VITEK [®] 2 AST-N355	Bacilos Gram-negativos de amostras de urina

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana em microrganismos de crescimento exigente como a *Neisseria* sp., *Haemophilus* sp., *Campylobacter* sp. entre outros são efetuados em galerias ATB.

2.2 - PROCESSAMENTO DE PRODUTOS BIOLÓGICOS

No laboratório de microbiologia do SPC são diariamente analisados vários produtos biológicos com a aplicação das várias metodologias e materiais descritos anteriormente. Serão então aqui descritos os procedimentos utilizados para cada produto biológico, sendo que estes são baseados e adaptados do “Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia” do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge [6].

2.2.1 - URINAS

Por norma, uma amostra de urina é um líquido biológico estéril, porém durante a micção esta pode arrastar microrganismo, podendo induzir a erros na interpretação da urocultura. Os agentes etiológicos mais frequentes nas crianças e adultos (sem outras doenças associadas) são bactérias da família das Enterobactereácea (grande destaque para a *Escherichia coli*), e por esse motivo são frequentemente isoladas no laboratório [6].

Quando o pedido de urocultura chega ao laboratório este vem acompanhado da urina em recipiente de transporte ou então esta já vem semeada em URILINE (produto da BioMérieux). O URILINE consiste num tubo fechado contendo uma lâmina com duas faces, cada uma delas coberta por um meio de cultura diferente, especificamente CLED e Mac.

Na figura 8 é possível observar o percurso do processamento laboratorial da amostra, assim como as várias sequências em relação aos resultados observados.

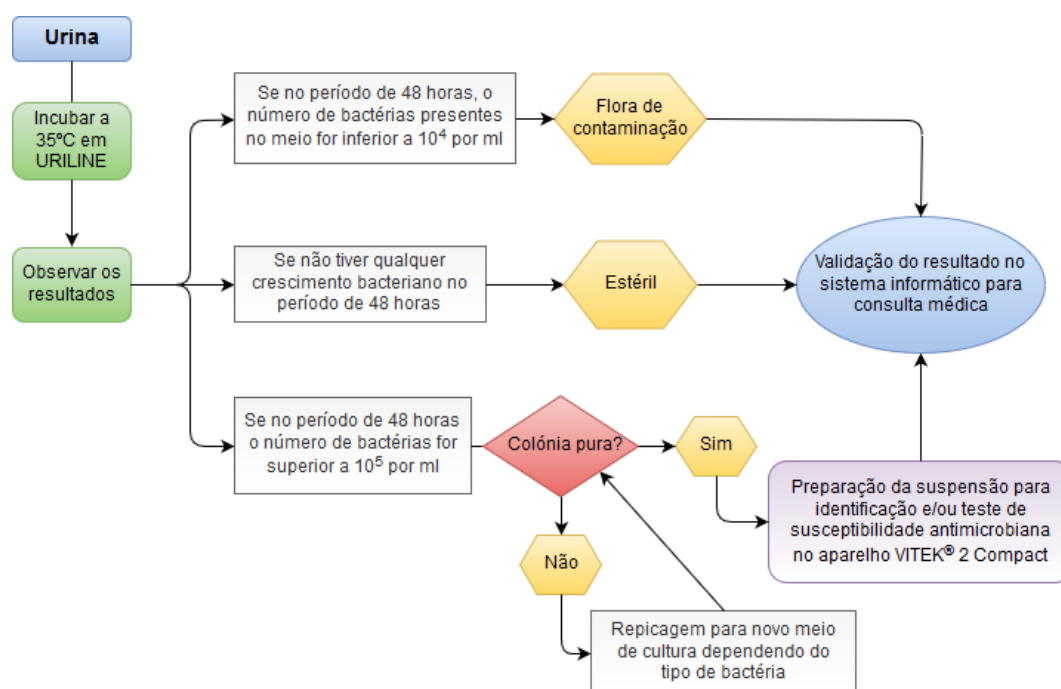


Figura 8 - Processo laboratorial da urina no SPC.

2.2.2 - LÍQUIDO CEFALO-RAQUIDIANO (LCR)

A colheita de LCR é um procedimento de carácter urgente e de extrema importância para o diagnóstico laboratorial de meningites. A meningite consiste na inflamação das meninges, conjunto de membranas que revestem e protegem o sistema nervoso central e do espaço subaracnoide, preenchido pelo LCR [33]. O diagnóstico bacteriológico do LCR permite determinar a presença de microrganismos, para tal devem ser realizadas simultaneamente hemoculturas.

Na tabela 6 estão listados os agentes etiológicos mais frequentes nas meningites agudas consoante a idade ou condição do paciente.

Tabela 6 - Agentes etiológicos mais frequentes nas meningites agudas em vários doentes [6].

Idade ou Condição	Microrganismo
Recém-nascido	<i>E. coli</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , Herpes simplex virus 2
< 2 meses	<i>S. agalactiae</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i>
< 10 anos	Vírus, <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Neisseria meningitis</i>
Adultos Jovens	Vírus, <i>N. Meningitis</i>
Adultos	<i>S. pneumoniae</i> , <i>N. meningitidis</i>
Idosos	<i>S. pneumoniae</i> , Bacilos Gram negativo, <i>L.monocytogenes</i>
Doentes Imunodeprimidos	<i>Cryptococcus neoformans</i>

Após a colheita do LCR, este deve ser mantido à temperatura ambiente ou de preferência na estufa a 37 °C (para preservar *N. meningitidis*). Para estudos virais este já pode ser refrigerado se necessário [6]. Sendo o LCR um produto estéril qualquer resultado positivo deve ser levado em conta e devidamente comunicado [6].

A figura 9 descreve o percurso do processamento laboratorial do LCR, assim como as várias sequências em relação aos resultados observados.

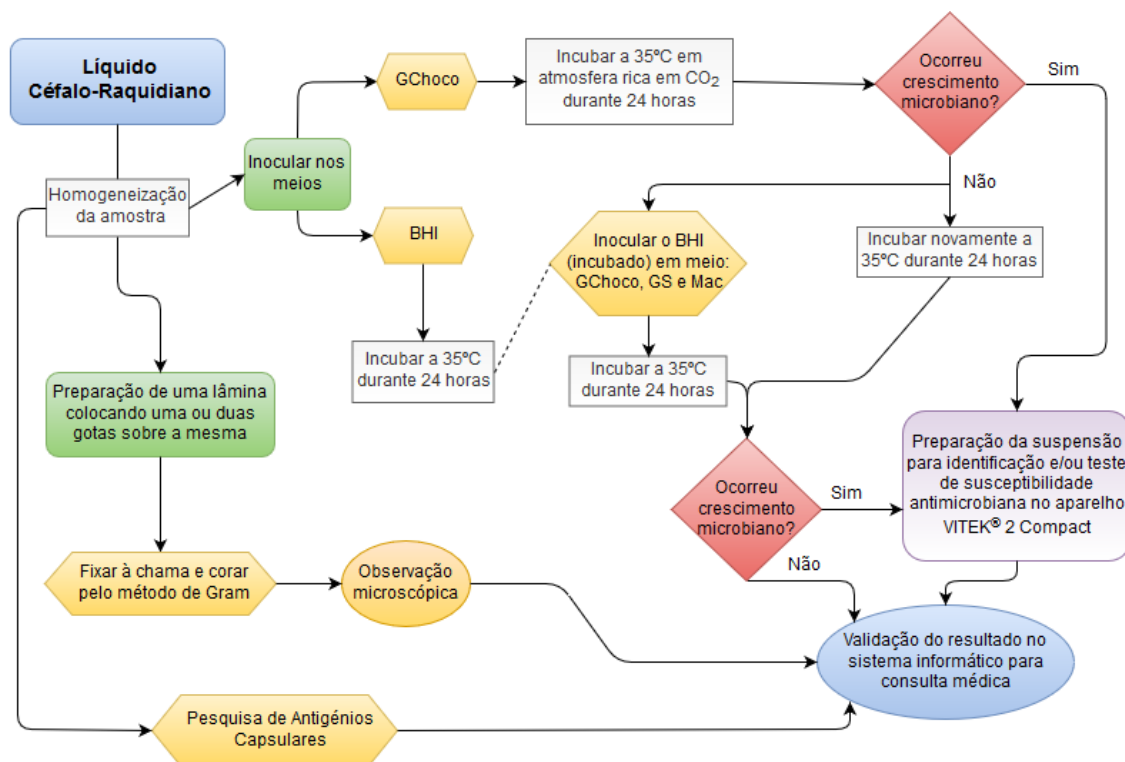


Figura 9 - Processo laboratorial do LCR no SPC.

A Pesquisa de Antígenos Capsulares (PAC) é de caráter obrigatório, principalmente na pediatria, sendo feita através de um kit de teste rápido (figura 10). É uma análise de aglutinação de látex presuntiva para a detecção qualitativa direta dos antígenos do *Streptococcus Grupo B*, *H. influenzae tipo B*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis B/ E.coli K1*, *N. meningitidis C/W135*, *N. meningitidis A/Y* no fluido cerebrospinal (certos anticorpos específicos ligam-se à superfície das partículas de látex, a agregação ocorrida adquire tamanho suficiente para a visualização a olho nu quando contrastada com um fundo preto). Um resultado positivo depende do nível de antígenos detetáveis e não substitui a cultura [6; 34].



Figura 10 - Kit de Pesquisa de Antígenos Capsulares.

2.2.3 - LÍQUIDOS DE SEROSAS

Os líquidos orgânicos são por norma produtos biologicamente estéreis, por esse motivo qualquer microrganismo encontrado deve ser investigado na sua identificação e suscetibilidade a antimicrobianos. A interpretação final deve ter em conta o estado clínico do doente e o microrganismo isolado [6].

Os líquidos de serosas incluem os líquidos pleural, pericárdico, sinovial e ascítico. Estes são inoculados diretamente no meio, se as amostras forem purulentas; pelo contrário se as amostras forem límpidas devem ser concentrados por centrifugação. Após a centrifugação dos líquidos aspira-se o sobrenadante com uma pipeta esterilizada deixando cerca de 1 mL de líquido no qual se ressuspende o sedimento [6].

Na figura 11 encontra-se descrito o procedimento laboratorial dos líquidos de serosas, assim como as várias sequências em relação aos resultados observados.

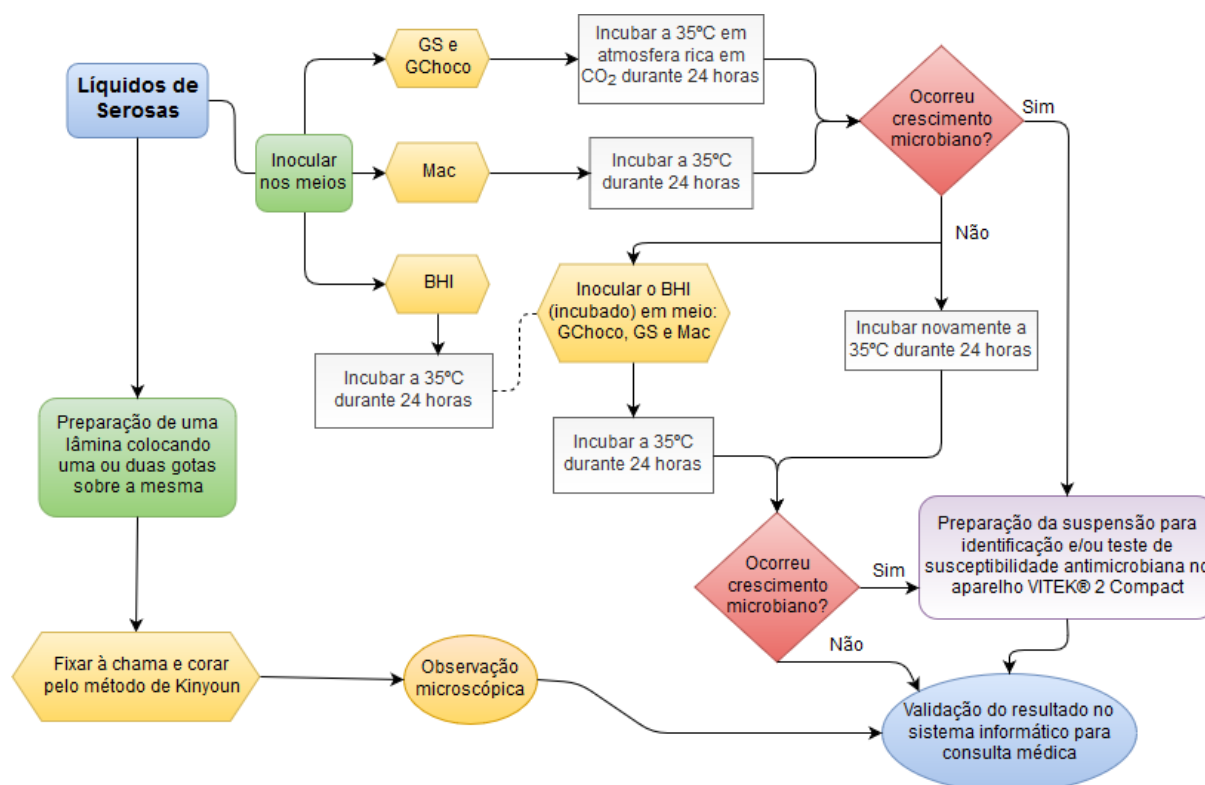


Figura 11 - Processo laboratorial dos líquidos de serosas no SPC.

2.2.4 - LAVADO BRÔNQUICO E LAVADO BRONCO-ALVEOLAR

O lavado brônquico e lavado bronco-alveolar são produtos biológicos obtidos por instilação e aspiração de uma solução não bacteriostática de NaCl 0,85% através do broncoscópio [6]. Esta solução ao ser aspirada retira parte das bactérias e células presentes no local que, quando analisadas mais tarde podem assim ajudar no diagnóstico de infecções e cânceros.

Na figura 12 está representado o procedimento laboratorial do lavado brônquico e lavado bronco-alveolar, assim como os vários procedimentos dependendo dos resultados observados.

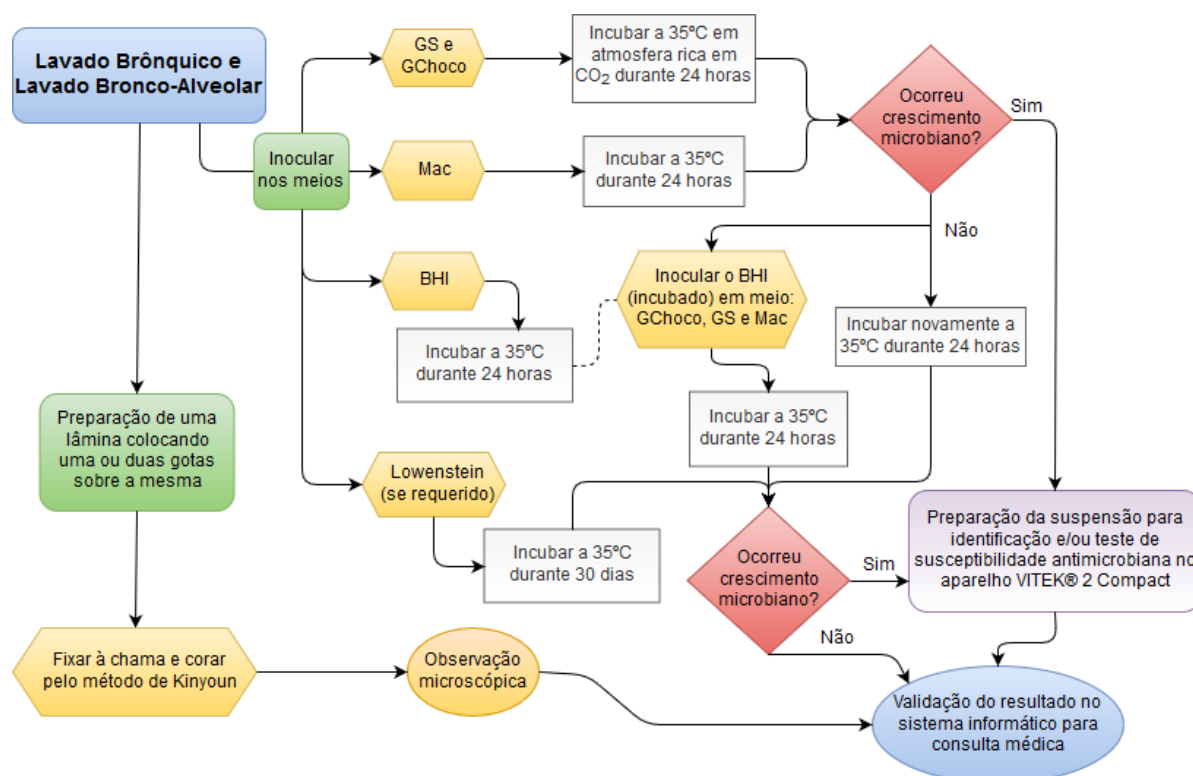


Figura 12 - Processo laboratorial dos lavados brônquico e bronco-alveolar no SPC.

2.2.5 - EXPETORAÇÕES E SECREÇÕES BRÔNQUICAS

O diagnóstico bacteriológico de infecções respiratórias a partir de expetorações e secreções brônquicas é por norma de difícil interpretação. Tal deve-se à contaminação das mesmas por flora comensal da orofaringe durante a colheita [6]. Devido à forte presença de bactérias pertencentes à flora normal da região, só são efetuados os testes de identificação e de susceptibilidade antimicrobiana quando se verifica uma predominância de um microrganismo potencialmente patogénico.

A presença de fungos em expetorações ou secreções brônquicas não é por norma valorizada, exceto se o paciente for imunodeprimido. Dessa forma é importante ter sempre em conta o diagnóstico do paciente.

A figura 13 esquematiza o procedimento laboratorial das expetorações e secreções brônquicas, assim como as várias sequências em relação aos resultados observados.

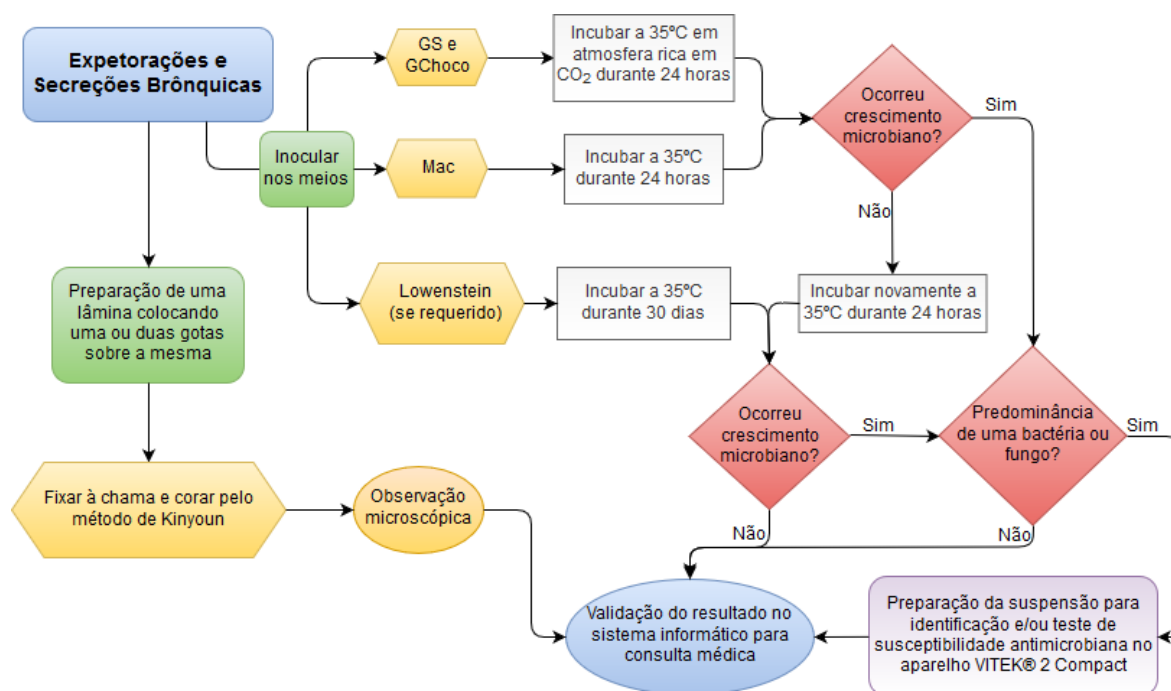


Figura 13 - Processo laboratorial das expetorações e secreções brônquicas no SPC.

2.2.6 - HEMOCULTURA

A hemocultura trata-se uma cultura microbiológica de sangue (em meio de cultura específico). Sendo o sangue um produto biologicamente estéril, considera-se então que o isolamento de um microrganismo a partir de uma hemocultura representa o agente etiológico da infeção. Em situações onde seja necessário efetuar mais do que uma hemocultura (sequencialmente), estas devem ser colhidas a partir de diferentes veias periféricas. De forma a conservar a possível presença da *N. meningitidis*, nunca refrigerar as hemoculturas após a colheita, assim deve-se manter o frasco em estufa a 37 °C [6].

Como a concentração dos microrganismos é baixa na maioria das bacteriemias, o volume de sangue colhido é um parâmetro crítico, principalmente em casos em que o paciente se encontra sob terapêutica antibiótica. Nas crianças o volume de sangue necessário à hemocultura é relativamente inferior, pois a concentração dos microrganismos durante o período de bacteriemia é mais elevada do que nos adultos. Os volumes recomendados, por punção venosa, são: para crianças 1 a 5 mL por punção venosa, e para adultos 10 a 30 mL [6].

Na figura 14 descreve-se o procedimento laboratorial das hemoculturas, assim como as várias sequências em relação aos resultados observados.

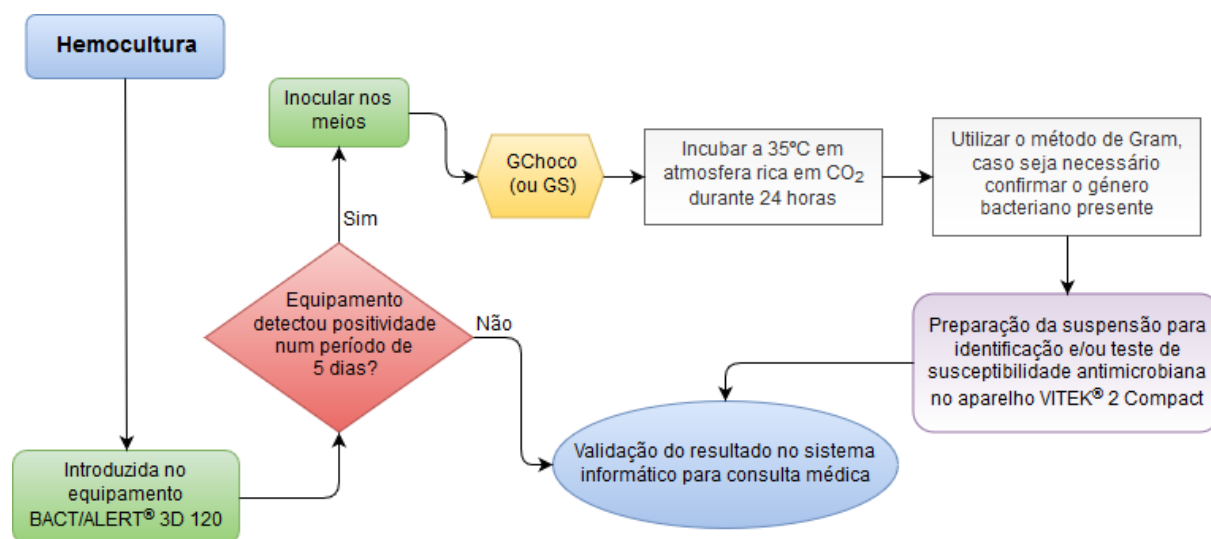


Figura 14 - Processo laboratorial das hemoculturas no SPC.

2.2.7 - EXSUDADO DA OROFARINGE

A avaliação bacteriológica do exsudado da orofaringe é um procedimento utilizado no diagnóstico de faringite bacteriana. A faringite trata-se de uma inflamação da garganta fundamentalmente causada por infeção viral, porém também pode ser causada por infeção bacteriana. Na faringite bacteriana o principal agente causal é *Streptococcus b-hemolítico* do grupo A, sendo este o foco do exame cultural [6]. Devido à existência de uma flora mista e de um grande número de outros *Streptococcus* na orofaringe, não é recomendado efetuar exame direto (coloração de Gram) [6].

Na figura 15 é possível observar o percurso do processamento laboratorial do exsudado da orofaringe, assim como as várias sequências em relação aos resultados observados.

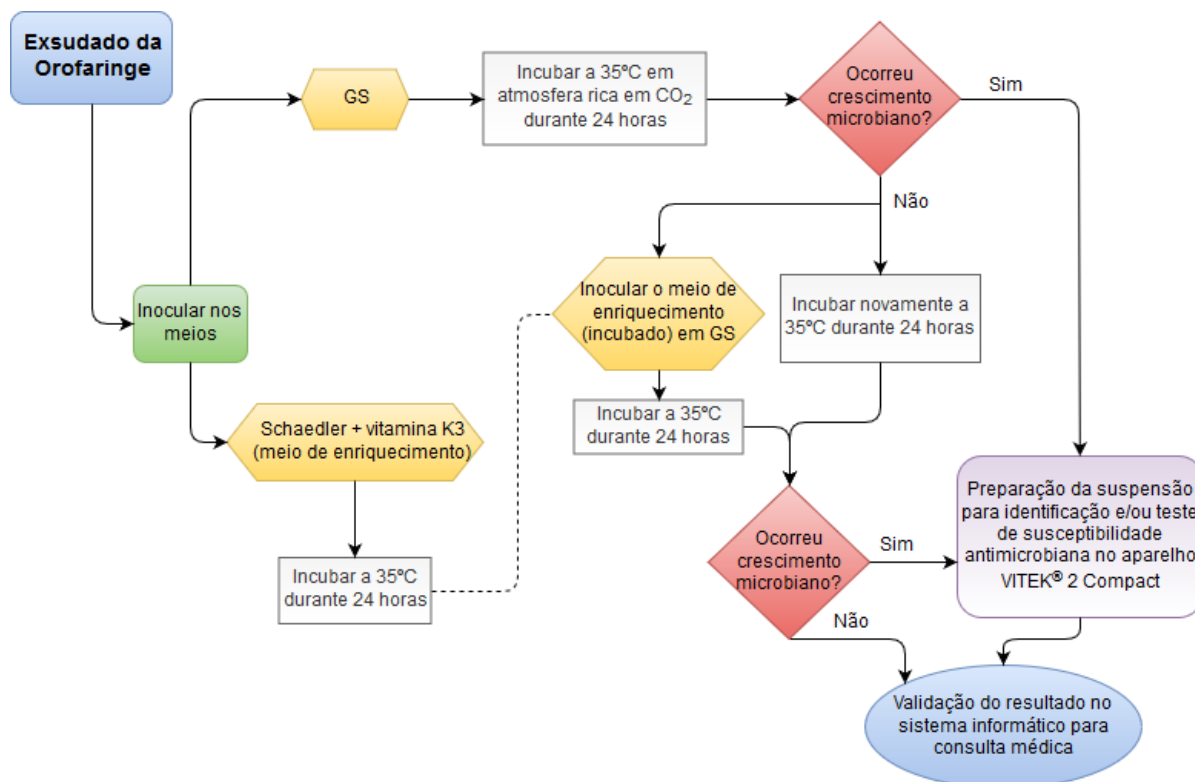


Figura 15 - Processo laboratorial do exsudado da orofaringe no SPC.

2.2.8 - EXSUDADO PARANASAL

O exsudado paranasal é utilizado no diagnóstico bacteriológico da sinusite, sendo este obtido através da punção do seio paranasal. A sinusite trata-se de inflamação dos seios paranasais, muitas vezes causada por infecção bacteriana ou viral, ou por alergia [35].

Na figura 16 é possível observar o percurso do processamento laboratorial do exsudado paranasal, assim como as várias sequências em relação aos resultados observados.

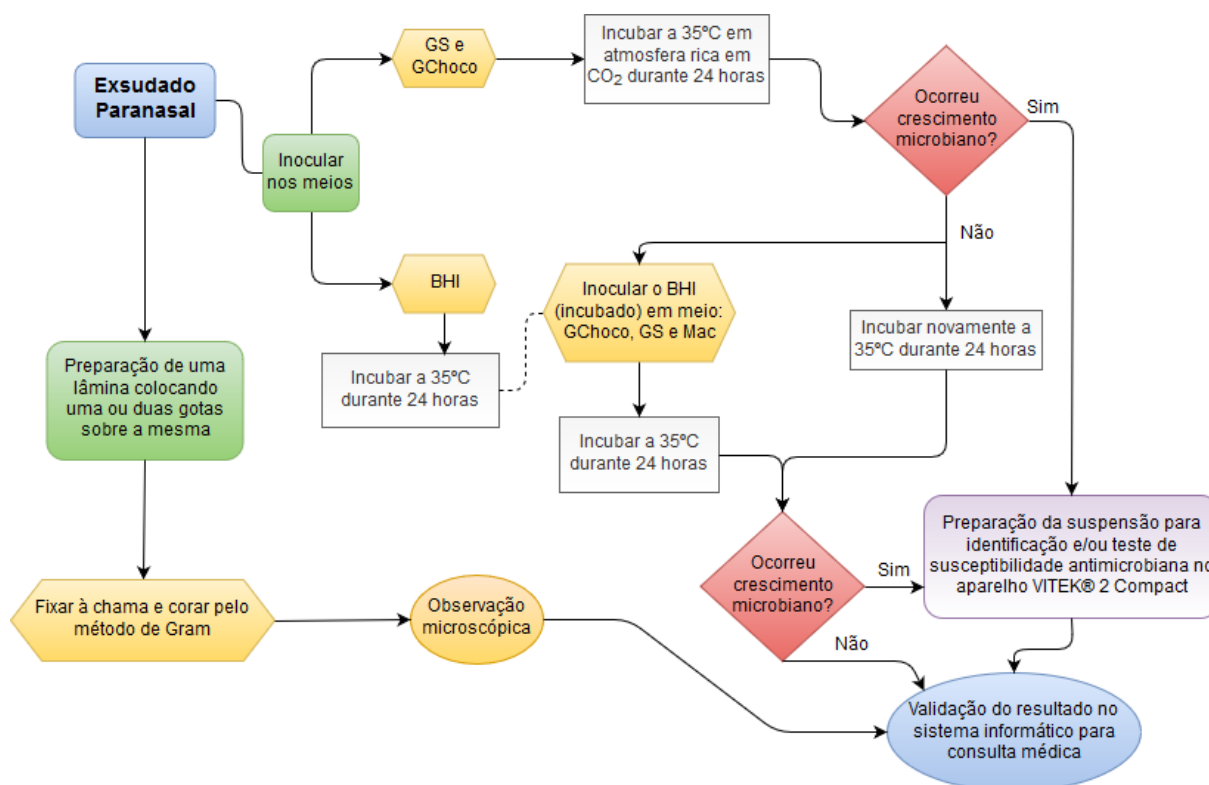


Figura 16 - Processo laboratorial do exsudado paranasal no SPC.

2.2.9 - EXSUDADOS OCULARES

A análise do exsudado ocular em exame bacteriológico permite determinar a presença do microrganismo responsável por infecções das estruturas internas e externas do olho. Nas infecções externas este é extraído a partir do saco conjuntival com o auxílio de uma zaragatoa. No caso do diagnóstico de infecções internas, a colheita é efetuada em cirurgia por um oftalmologista [6]. Nas infecções oculares o número de bactérias isoladas é geralmente baixo, devido à constante ação de lavagem das lágrimas, por esse motivo utiliza-se uma grande quantidade de exsudado a inocular [6].

A figura 17 mostra o percurso do processamento laboratorial do exsudado ocular, assim como as várias sequências em relação aos resultados observados.

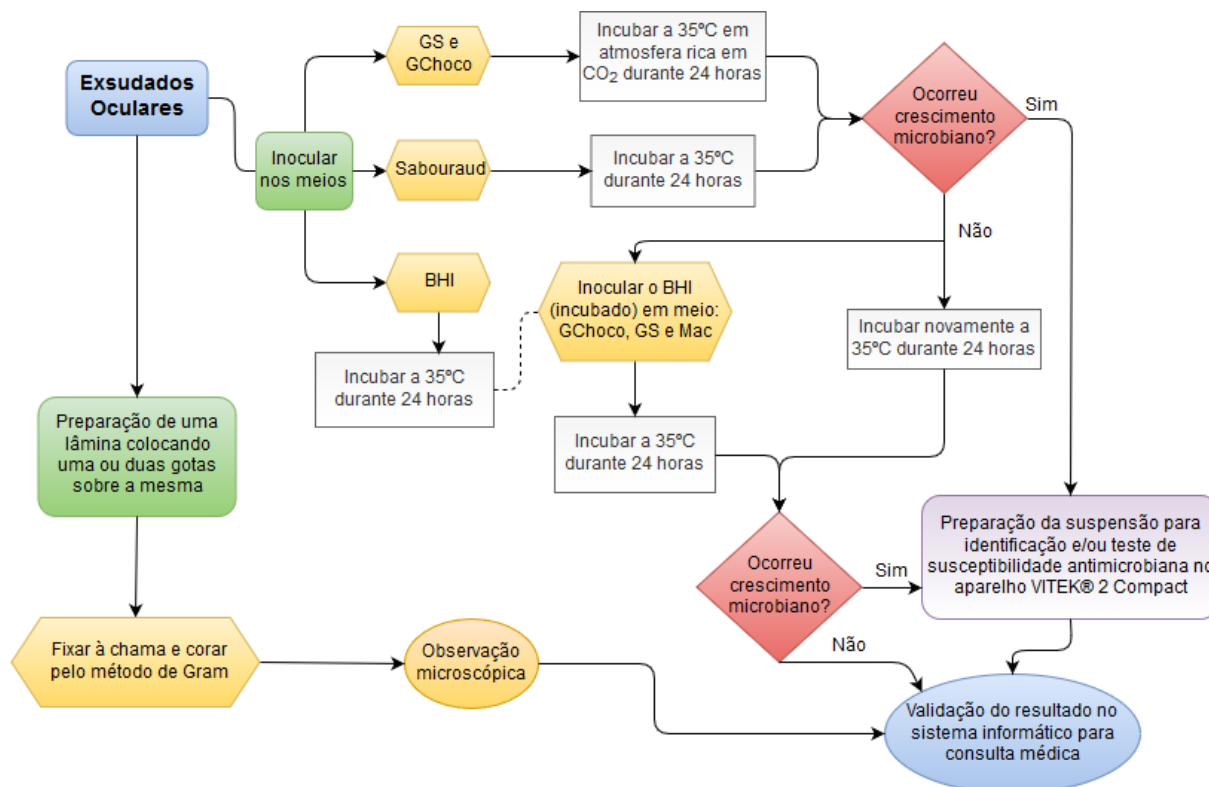


Figura 17 - Processo laboratorial dos exsudados oculares no SPC.

2.2.10 - PUS DE OUVIDO

A otite média é uma infecção muito frequente em bebés e crianças. De forma a diagnosticar o microrganismo responsável pela infecção é efetuado o exame bacteriológico do pus de ouvido [6].

O pus de ouvido é extraído por cirurgia através de drenagem no local da infecção. Se houver rutura do tímpano utiliza-se um espéculo auricular e colhe-se o exsudado com uma zaragatoa [6].

A figura 18 representa o procedimento laboratorial do pus de ouvido, assim como as várias sequências em relação aos resultados observados.

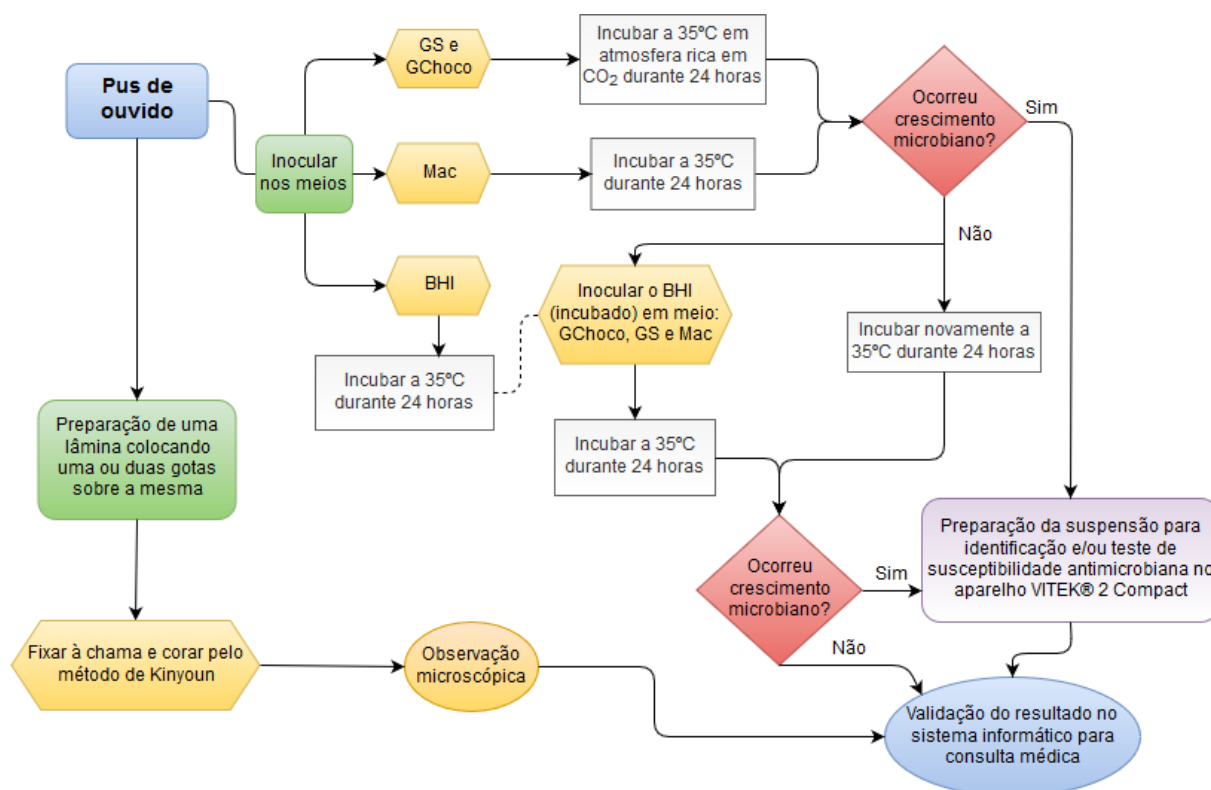


Figura 18 - Processo laboratorial do pus de ouvido no SPC.

2.2.11 - EXSUDADOS PURULENTOS

Consoante o local da lesão ou da inflamação, o exsudado purulento deve ser colhido por punção e aspiração através de agulha e seringa podendo também ser colhido em caso de feridas abertas com o auxílio de uma zaragatoa, sendo que neste caso é colocada em meio de transporte especial (Stuart ou Amies). Não usar zaragatoas secas [6].

A figura 19 descreve o percurso do processamento laboratorial dos exsudados purulentos, assim como as várias decisões em relação aos resultados observados.

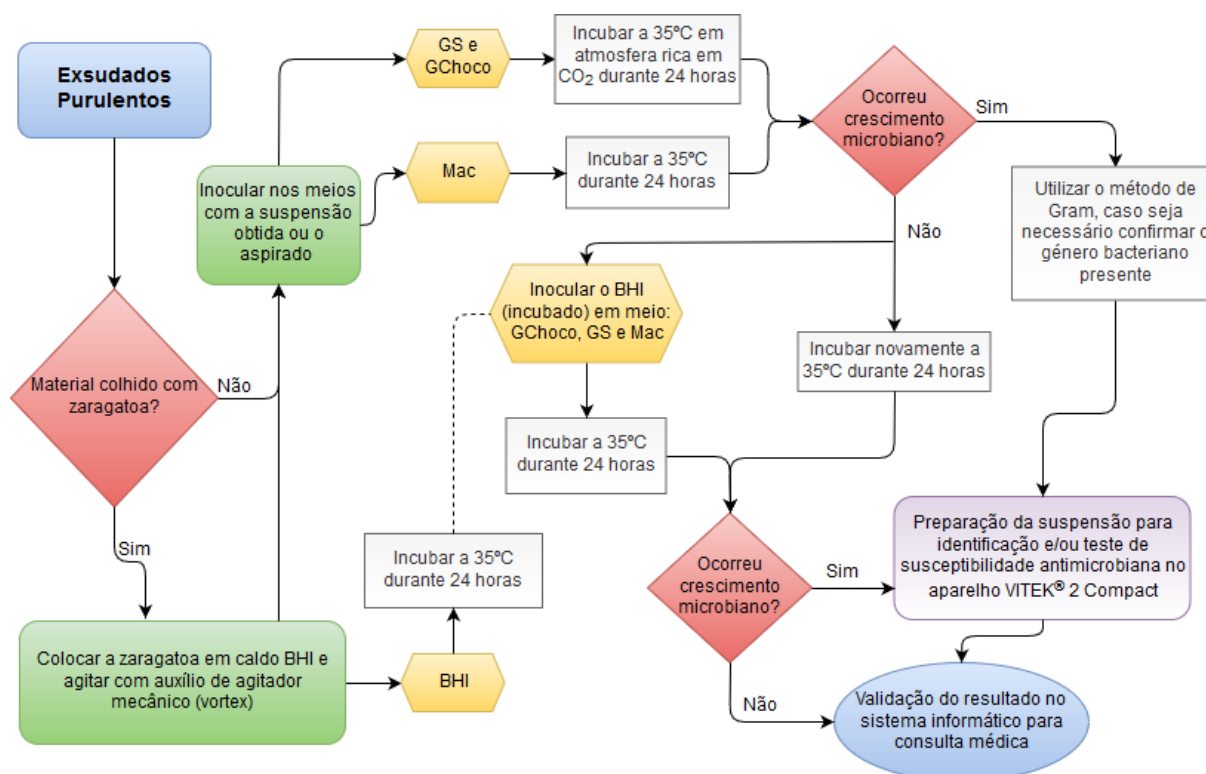


Figura 19 - Processo laboratorial dos exsudados purulentos no SPC.

2.2.12 - EXSUDADO VAGINAL

As infecções do aparelho genital feminino são normalmente causadas por microrganismos endógenos cuja patogenicidade é ativada por fatores do hospedeiro ou por desequilíbrio da flora saprófita. Os exsudados vaginais são colhidos com o auxílio de uma zaragatoa de alginato de cálcio, esta é depois colocada em meio de transporte especial (Stuart ou Amies). É efetuado um exame direto (pelo método de Gram), para observar a presença ou não de *Trichomonas vaginalis* e de elementos leveduriformes, e um exame cultural [6].

Na figura 20 é possível observar o percurso do processamento laboratorial do exsudado vaginal, assim como as várias sequências em relação aos resultados observados.

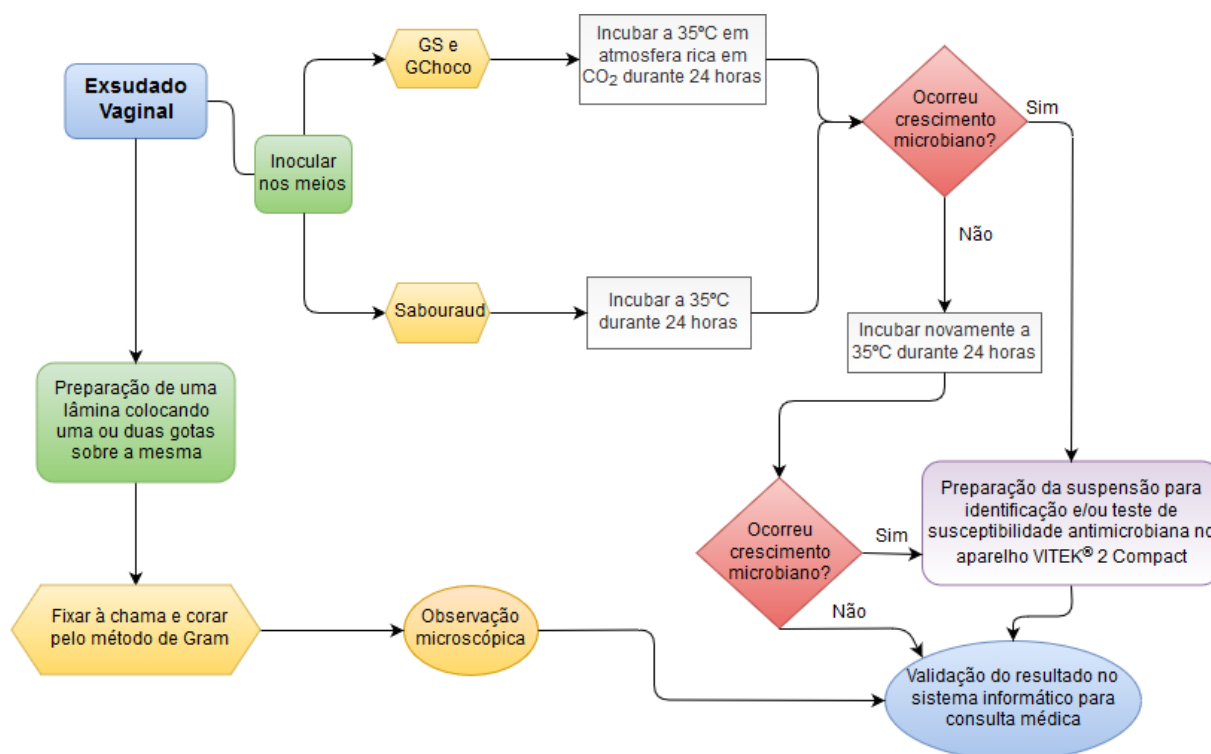


Figura 20 - Processo laboratorial do exsudado vaginal no SPC.

2.2.13 - ESPERMOCULTURA

A espermocultura permite a pesquisa de infecções, do trato genital masculino e da próstata por microrganismos. Se não for de imediato semeada, deve estar na estufa a 37 °C.

Na Figura 21 está esquematizado o percurso do processamento laboratorial da espermocultura, assim como as várias sequências em relação aos resultados observados.

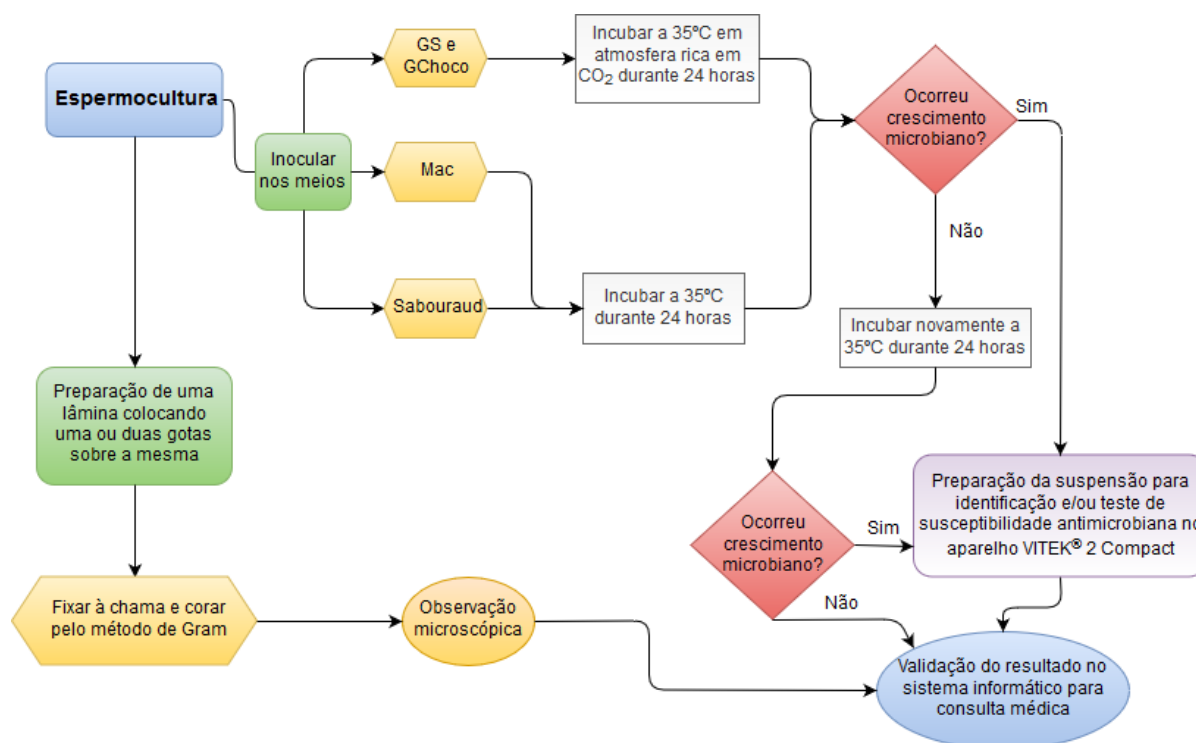


Figura 21 - Processo laboratorial da espermocultura no SPC.

2.2.14 - FEZES

As infecções do aparelho gastrointestinal têm uma alta incidência na população em geral, com grande morbidade principalmente em crianças e idosos. Estas infecções são normalmente provocadas pelas *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. em crianças, e pelas *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp. e *Yersinia enterocolítica* em adultos [6]. Estas infecções são analisadas em fezes por exame bacteriológico, após inoculação em meios propícios ao crescimento de microrganismos, e exame parasitológico. Para a execução destes exames devem ser colhidas até três amostras de fezes, de preferência em dias diferentes, escolhendo, sempre que possível uma porção com muco, pus ou sangue [6].

A figura 22 representa o procedimento laboratorial do exame bacteriológico das fezes, assim como as várias sequências em relação aos resultados observados.

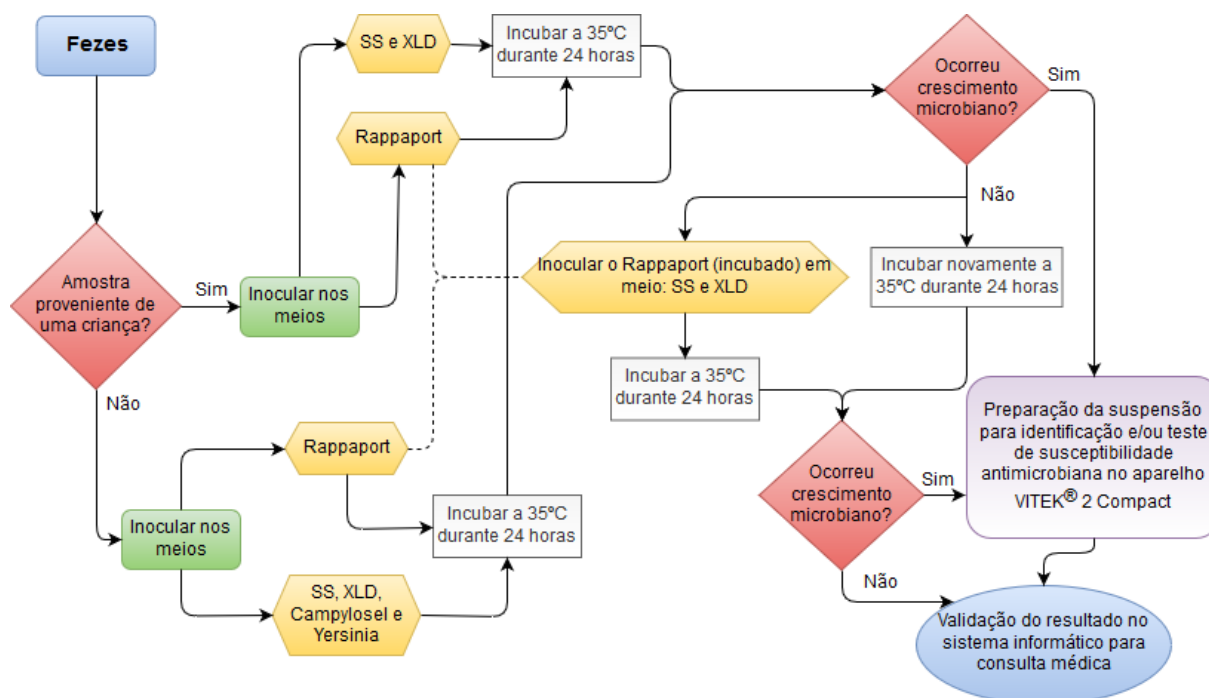


Figura 22 - Processo laboratorial do exame bacteriológico das fezes no SPC.

Em relação ao exame parasitológico, este é efetuado com auxílio de uma ansa recolhendo uma pequena quantidade de fezes que é colocada numa lâmina com uma gota de água destilada, sobre a qual se sobrepõe uma lamela antes da observação ao microscópio. A observação ao microscópio deve ser avaliada a presença de ovos ou de larvas de parasitas.

2.2.15 - CATETERES VASCULARES

Em casos que o doente com cateter vascular demonstre sinais de uma bacteriemia o envio do cateter para exame microbiológico é importante, de modo a avaliar a possibilidade de este ser o responsável pela patologia. Alguns dos agentes bacterianos mais frequentemente detetados em cateteres são o *Staphylococcus* spp. (coagulase negativo) e de *Streptococcus* spp. (“grupo viridans”) [6]. Antes de ser retirado o cateter, deve ser colhido sangue para hemocultura de uma veia periférica não cateterizada. É importante que o cateter seja colhido assepticamente (5 cm) e colocado num recipiente estéril e seco [6].

A figura 23 apresenta o procedimento laboratorial dos cateteres vasculares, assim como as várias sequências em relação aos resultados observados.

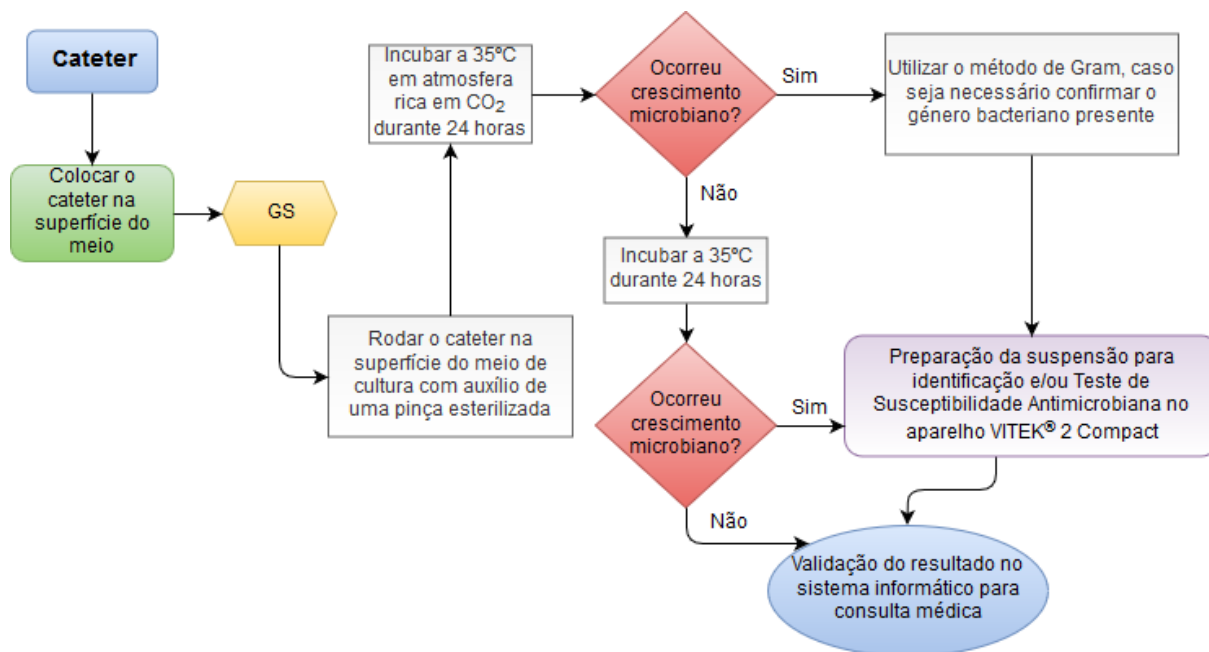


Figura 23 - Processo laboratorial dos cateteres vasculares no SPC.

É importante referir que o crescimento microbiano deve ser superior a 15 colónias para proceder à identificação. Por último, de forma a confirmar se o agente patogénico provém do cateter, o resultado obtido pelo exame cultural é comparado com o resultado da hemocultura [6].

2.2.16 - ZARAGATOA NASAL

A análise bacteriológica da zaragatoa nasal tem como objetivo determinar a presença de *S. aureus* Meticilina Resistentes (MRSA) [6]. Esta análise é de extrema importância em ambiente hospitalar uma vez que esta bactéria pode transmitir a resistência à Meticilina a outras bactérias presentes no meio hospitalar. Por norma, esta análise é efetuada em doentes internados.

A figura 24 apresenta o procedimento laboratorial da zaragatoa nasal, assim como as várias sequências em relação aos resultados observados.

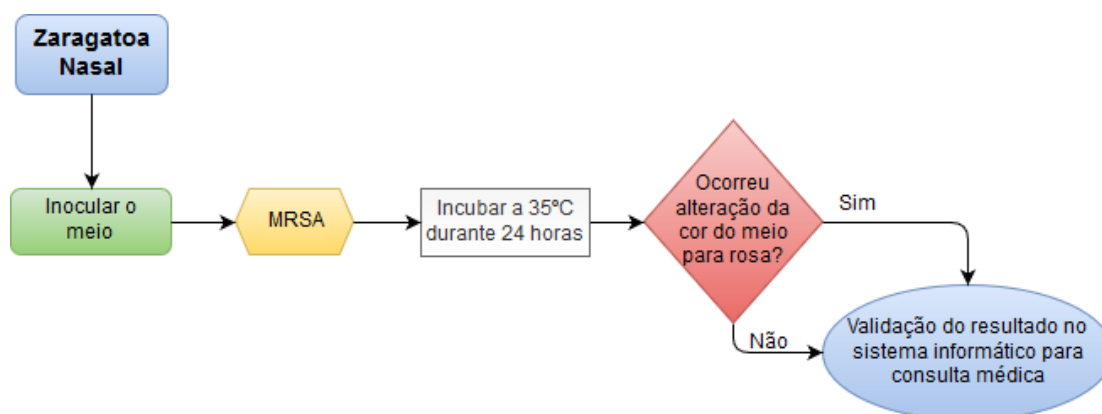


Figura 24 - Processo laboratorial da zaragatoa nasal no SPC.

2.2.17 - ZARAGATOA RETAL

A análise bacteriológica da zaragatoa retal tem como objetivo determinar a presença de bactérias Gram negativas produtoras de carbapenemases. Esta análise é de extrema importância uma vez que as carbapenemases são enzimas que degradam os carbapenemos, antibióticos de uso exclusivamente hospitalar. A capacidade de sintetizar carbapenemases pode ser transmitida a outras bactérias tornando-as resistentes. Por norma, esta análise é efetuada em pacientes internados.

A figura 25 demonstra o procedimento laboratorial da zaragatoa retal, assim como as várias sequências em relação aos resultados observados.

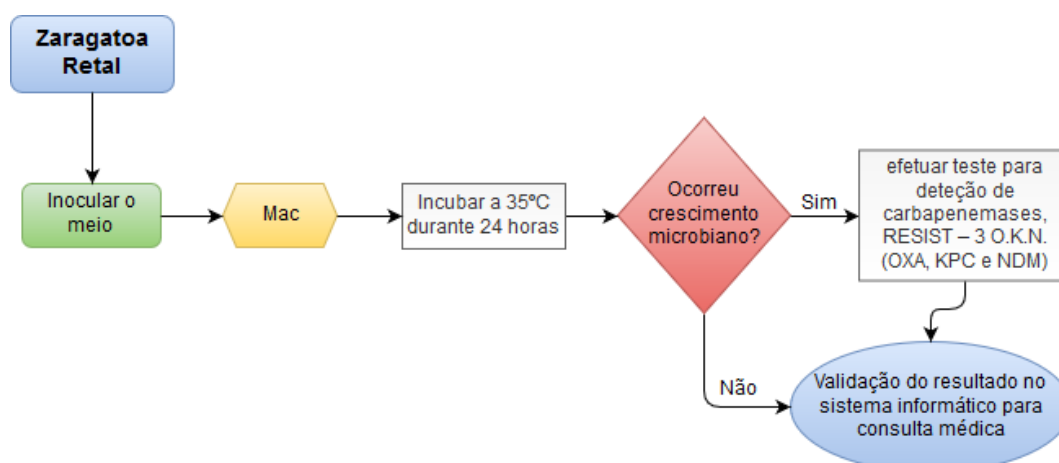


Figura 25 - Processo laboratorial da zaragatoa retal no SPC.

2.3 - ROTINA LABORATORIAL

Começa-se por imprimir uma lista de trabalho onde estão listadas, por ordem de entrada no laboratório, todas as amostras que faltam ser processadas ou cujo resultado da presença ou não de microrganismos ainda não foi confirmada (Figura 26). Retira-se da incubadora todos os meios semeados (com um a dois dias de incubação) e após a devida análise macroscópica e de acordo com as evidências presentes (como o aspeto, cheiro e distribuição) das colónias, identifica-se se a amostra se encontra estéril, se é uma flora de contaminação, se é uma flora normal da região ou se existe a predominância de uma bactéria ou fungo.



Figura 26 - Lista de trabalho e amostras.

Nas amostras onde existe a presença predominante de algum tipo de microrganismo, deve-se verificar se a colónia é pura para garantir uma correta identificação no VITEK[®] 2 Compact e identificar qual a carta de identificação e a carta para testes de suscetibilidade antimicrobiana a utilizar.

Assim, com base no que foi referido, efetua-se uma suspensão da colónia pura num tubo com 3 mL de solução salina (verificando a densidade ótica com o DensiChek de acordo com a escala de McFarland, sendo que esta depende do microrganismo). Desta solução é pipetado 145µL (bactéria Gram negativa) ou 280µL (bactéria Gram positiva) para outro tubo com 3 mL de solução salina, depois coloca-se a carta de identificação na suspensão inicial e a carta para testes de suscetibilidade antimicrobiana na diluição (Figura 27).



Figura 27 - Conjunto de suspensões com cartas de identificação e testes de suscetibilidade antimicrobiana.

Depois de preparado o conjunto de suspensões e cartas, colocamos no equipamento VITEK[®] 2 Compact (figura 28) que está concebido para proporcionar resultados de identificação ou suscetibilidade após 5 a 8 horas. Por último, os resultados são validados no sistema informático e são enviados para o médico responsável pelo doente.



Figura 28 - VITEK[®] 2 Compact.

CAPÍTULO 3 - HEMATOLOGIA E COAGULAÇÃO

O estágio na área de Hematologia e Coagulação no SPC, decorreu de 19 de Novembro de 2018 a 21 de Dezembro de 2018, sobre a coordenação da Dr.^a Filomena Reis.

Proporcionou a aquisição de conhecimentos teórico-práticos nas áreas da hematologia e coagulação, bem como compreensão das metodologias e materiais utilizados na elaboração do hemograma, do teste de velocidade de sedimentação eritrocitária e das provas de coagulação, em suma o estudo dos elementos sanguíneos e dos fatores de coagulação.

Neste capítulo são descritos os métodos, materiais e equipamentos utilizados nas áreas da Hematologia e Coagulação, assim como os parâmetros avaliados neste laboratório.

3.1 - MATERIAIS E METODOLOGIAS

No laboratório de Hematologia e Coagulação, os materiais e metodologias utilizados para o estudo dos elementos sanguíneos e dos fatores de coagulação recorrem a equipamentos e técnicas especializadas na avaliação das células sanguíneas e do mecanismo de coagulação.

3.1.1 - HEMOGRAMA

O hemograma é um exame de rotina laboratorial que consiste na contagem diferencial das células sanguíneas (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) em amostras de sangue periférico, permitindo assim diagnosticar possíveis distúrbios hematológicos.

No SPC para efetuar este exame o laboratório de hematologia utiliza o UniCel® DxH 600, equipamento que permite a contagem e a avaliação das células sanguíneas em amostras de sangue colhidas com EDTA, isto é, permite determinar o número de eritrócitos, leucócitos, plaquetas e reticulócitos, dando também indicações ao técnico de possíveis alterações no tamanho, coloração e forma dos mesmos. Além disso, este equipamento permite também analisar alguns líquidos orgânicos como líquido céfalo-raquidiano, líquido pleural, líquido sinovial, determinando o número total de células e diferenciando se estas são mononucleares ou polinucleares.

Do hemograma fazem parte o eritrograma, o leucograma e o plaquetograma. O **Eritrograma** consiste no estudo quantitativo e qualitativo dos eritrócitos, descrevendo o número de eritrócitos; a quantidade de hemoglobina; hematócrito (percentagem de sangue que é ocupada por eritrócitos); volume corpuscular médio (avalia o tamanho médio dos eritrócitos); hemoglobina corpuscular média (quantidade média de hemoglobina nos eritrócitos); amplitude de distribuição dos eritrócitos (determina a variação do tamanho dos eritrócitos); concentração corpuscular média de hemoglobina (concentração média de hemoglobina por eritrócito) [36].

O **Leucograma** - consiste na avaliação quantitativa e qualitativa dos leucócitos, contabilizado o valor total de leucócitos e de cada um dos seus principais tipos [36].

O **Plaquetograma** - consiste na avaliação quantitativa e qualitativa, onde se obtém o número de plaquetas e o volume plaquetário médio (tamanho das plaquetas) [36].

3.1.2 - ESFREGAÇO SANGUÍNEO

O esfregaço sanguíneo, é uma técnica utilizada com o intuito de avaliar qualitativamente as células sanguíneas presentes numa amostra de sangue. Quando analisado ao microscópio permite efetuar uma avaliação visual do tamanho, da forma, da cor, da presença de inclusões e de aglutinação nas células sanguíneas.

A técnica do esfregaço sanguíneo tem por base a deposição de uma gota de sangue num dos extremos da lâmina, de seguida é encostada outra lâmina à gota de sangue, com uma inclinação de 45°, e arrastada sobre a primeira lâmina.

De forma a facilitar a diferenciação microscópica das células o esfregaço sanguíneo é corado com o corante de Wright que deverá cobrir a lâmina durante 5 minutos, e tamponado com um tampão fosfato, cobrindo a lâmina durante 20 minutos sem perder o corante de Wright e tentando manter o mais homogéneo possível. Por fim, é feita a avaliação microscópica do esfregaço sanguíneo sendo referida todos os tipos de alterações celulares (forma, cor, tamanho, presença de inclusões).

O corante de Wright e o tampão fosfato são preparados no SPC.

3.1.3 - PROVAS DE COAGULAÇÃO

As provas de coagulação são exames laboratoriais de rotina utilizados para a avaliação dos fatores de coagulação. Esta análise é efetuada numa amostra de sangue colhida em tubo de citrato trissódico (anticoagulante) e após centrifugação a 3500 rotações por minuto durante 15 minutos. O anticoagulante impede que a cascata de coagulação seja ativada, e a centrifugação irá permitir a separação das células sanguíneas dos componentes plasmáticos.

A adição de cloreto de cálcio (feita pelo equipamento) inibe os efeitos do anticoagulante, permitindo assim executar as provas de coagulação, determinando assim o tempo de protrombina, o tempo de tromboplastina parcial ativada e a dosagem do fibrinogénio. Além destas provas, também é feita a avaliação da atividade do D-dímero. Todas estas provas são efetuadas no equipamento Sysmex CA-600 Systems (Siemens Healthcare Diagnostics).

3.2 - PARÂMETROS AVALIADOS

Como dito anteriormente, o hemograma e a avaliação do esfregaço sanguíneo permitem avaliar e analisar os eritrócitos, reticulócitos, leucócitos e as plaquetas de forma a obter o máximo de informação relativamente às células sanguíneas. As provas de coagulação permitem determinar possíveis alterações a nível dos mecanismos de coagulação.

Além dos parâmetros descritos, também é usual em determinadas situações avaliar a velocidade de sedimentação, não como um teste de exclusão de patologias, mas como um indício de uma possível patologia.

3.2.1 - ERITRÓCITOS

O eritrócito é uma célula altamente especializada, cuja função primordial é transportar oxigénio para os tecidos, e destes levar dióxido de carbono até aos pulmões, onde é expelido para fora do organismo.

Para uma avaliação completa dos eritrócitos presente numa amostra, também é necessário efetuar uma análise da morfologia eritrocitária a partir do esfregaço de sangue periférico, sempre que este seja necessário.

Na tabela 7 estão descritas as alterações morfológicas e as suas possíveis causas.

Tabela 7 - Alterações morfológicas a nível dos eritrócitos e possíveis causas para a sua ocorrência [37].

Alteração	Tipo de alteração e possíveis causas
No tamanho (Anisocitose)	Microcitose - refere-se a eritrócitos que apresentam um tamanho menor do que o normal. São microcíticas as anemias ferropénicas, as talassemias e as anemias sideroblásticas.
	Macrocitose - refere-se a eritrócitos que apresentam um tamanho maior do que o normal. Quando o volume corpuscular médio excede 100 fL (femto litro) dizemos que há macrocitose. Provocado por deficiência em vitamina B12 ou ácido fólico, hipotireoidismo, doença hepática, consumo de álcool e tabaco.
Na coloração (Anisocromia)	Hipocromia - este termo refere-se à presença de eritrócitos com coloração mais pálida que o normal, devido a uma redução do conteúdo de hemoglobina. A causa mais comum de redução da síntese de hemoglobina é a deficiência de ferro.
	Policromasia - é o termo utilizado para descrever a coloração róseo-azulada dos eritrócitos imaturos, particularmente os reticulócitos jovens. Essas células, devido à presença de RNA ribossómico e hemoglobina, absorvem simultaneamente corantes básicos e eosina. Elas são liberadas quando os altos níveis de eritropoietina levam à liberação de reticulócitos imaturos.
Na forma (Poiquilocitose)	Esferócitos - são eritrócitos de forma esférica por terem perdido porções de membrana. Isso ocorre na esferocitose hereditária, onde existe um defeito no citoesqueleto da membrana eritrocitária, mas pode ocorrer também em condições adquiridas como nas anemias imuno-hemolíticas.
	Estomatócitos - são eritrócitos que apresentam uma fenda semelhante a uma boca na região central da célula. Podem ocorrer de forma esporádica em indivíduos normais, e em numerosas situações clínicas, sendo as mais comuns o abuso de álcool e a hepatopatia alcoólica.
	Dacriócitos - eritrócitos em forma de lágrima aparecem quando existe fibrose da medula óssea. Podem também ocorrer em algumas anemias hemolíticas e nas anemias megaloblásticas.
	Eritrócitos em alvo - distribuição anormal de hemoglobina pode resultar na formação de uma célula com uma mancha central de hemoglobina rodeada por uma área de palidez, chamada célula em alvo.
	Eritrócitos falciformes - aparecem nas doenças falciformes (hemoglobinas anormais). A desoxi-hemoglobina S tende a formar polímeros que torcem a membrana do eritrócito em forma de foice ou crescente.
	Equinócitos - 10 a 30 pequenas espículas regulares. Aparecem devido insuficiência renal e/ou problemas hepáticos e queimaduras graves.
	Acantócitos - 2 a 20 espículas de comprimento e distribuição irregulares. Podem ser observados na α - β -lipoproteinemia, nas doenças hepáticas.
	Esquizócitos - fragmentos eritrocitários, muitos dos quais espiculados. Ocorre por trauma mecânico na circulação por anormalidades do coração e grandes vasos ou por depósitos de fibrina.
	Corpúsculos de Howell-Jolly - restos de material nuclear presentes no interior dos eritrócitos. Normalmente são removidos pelo baço.
	Pontilhado basófilo - Consiste de pequenas e numerosas inclusões contendo RNA dispersas no citoplasma dos eritrócitos. Podem aparecer em diferentes condições clínicas, que incluem anemias hemolíticas, megaloblásticas, mielofibrose idiopática e hepatopatias.

Qualquer tipo de alteração morfológica ou numérica dos eritrócitos deve ser devidamente comunicada ao médico responsável pelo utente.

3.2.2 - RETICULÓCITOS

Os reticulócitos são eritrócitos imaturos e em pacientes considerados saudáveis representam cerca de 0,5 a 2,5% do número total de eritrócitos [36; 38]. Os reticulócitos são produzidos pela medula óssea (órgão hematopoiético) que os liberta para a corrente sanguínea quando o número de eritrócitos presentes no sangue não consegue colmatar as necessidades fisiológicas. Os reticulócitos tal como os eritrócitos não tem núcleo, porém possuem restos de material genético (RNA). No período de um a dois dias os reticulócitos perdem o RNA transformando-se em eritrócitos maduros [36; 38]. Assim, este parâmetro permite determinar se há uma resposta adequada por parte da medula óssea a um aumento da necessidade de produção de eritrócitos, por exemplo em casos de anemia hemolítica. Dessa forma, um valor de reticulócitos acima do normal aponta para um bom funcionamento da medula óssea, em resposta ao número baixo de eritrócitos em circulação. Se a análise revelar um número de reticulócitos abaixo do normal, este poderá ser resultado de um problema a nível da produção de eritrócitos, por exemplo em casos de anemia por deficiência de ferro, vitamina B12, folato ou por outros tipos de patologia que estejam a afetar o bom funcionamento da medula óssea [36; 38].

A contagem do número de reticulócitos por si só não diagnostica uma doença específica, pois, o seu significado varia consoante outros parâmetros. Esta contagem deve ser feita até 2 horas após a colheita.

3.2.3 - LEUCÓCITOS

Os leucócitos (glóbulos brancos) são uma parte inerente da defesa do corpo contra organismos infecciosos e substâncias estranhas. De forma a manter o organismo protegido é necessário que haja uma quantidade suficiente de glóbulos brancos, aptos para agir em situações de invasão do corpo por parte de organismos infecciosos ou substâncias estranhas [39].

Os leucócitos estão divididos em 5 tipos principais [39]:

- Neutrófilos, que participam na defesa contra bactérias, promovem a fagocitose e a lise das bactérias;
- Linfócitos, alguns participam na defesa local contra antígenos de corpos estranhos, já outros são responsáveis por todo o lado humoral da defesa contra vírus, bactérias e alérgenos;
- Monócitos, que participam na defesa contra bactérias, fungos, vírus e corpos estranhos (por fagocitose), além disso também destroem as células endógenas no final dos seus ciclos de vida;
- Eosinófilos, têm como função a defesa contra parasitas, também desempenham um papel na regulação negativa de reações de choque anafilático e respostas autoimunes, controlando assim a influência das células basófilas;
- Basófilos, têm como principal função regular a circulação através da liberação de hormonas que aumentam a permeabilidade vascular em locais de atividade antigénica, regulando assim o influxo das outras células inflamatórias.

Os parâmetros avaliados no hemograma quanto aos leucócitos cingem-se à análise quantitativa (número de leucócitos de cada tipo) e estão associados a diferentes quadros clínicos. Estes estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8 - Alterações dos leucócitos e quadro clínico associado [40-43].

Tipo de Célula	Alteração numéricas	Quadros clínicos ou distúrbios associados
Neutrófilo	Neutrofilia	As infeções, lesões, distúrbios inflamatórios, medicamentos e certas leucemias podem aumentar o número de neutrófilos no sangue. O aumento do número de neutrófilos, é por isso uma reação necessária do corpo à medida que tenta eliminar ou expulsar um organismo ou uma substância estranha.
	Neutropenia	As infeções bacterianas, distúrbios alérgicos, alguns tratamentos com medicamentos e distúrbios autoimunes podem resultar na destruição dos neutrófilos, outra das possíveis causas é redução da sua produção na medula óssea devido cancro, infeções virais, deficiência em vitamina B12 ou folato.

Linfócito	Linfocitose	A causa principal do aumento do número de linfócitos é infeção viral, porém certos tipos de cancro, como leucemia linfocítica, podem produzir um aumento no número de linfócitos, em parte pela liberação de linfócitos imaturos (linfoblastos) na corrente sanguínea.
	Linfocitopenia	O número de linfócitos no sangue, reduz devido a infeções virais, desnutrição entre outros distúrbios.
Monócito	Monocitose	O aumento do número de monócitos está normalmente associado à resposta a infeções crónicas, distúrbios autoimunes e certos tipos de cancro.
	Monocitopenia	A diminuição quanto ao número de monócitos pode ser causada por quaisquer distúrbios que originam neutropenias e linfocitopenias.
Eosinófilo	Eosinofilia	As causas mais comuns para o aumento do número de eosinófilos, são: distúrbios alérgicos, infeções por parasitas e certos tipos de cancro.
	Eosinopenia	A diminuição quanto ao número de eosinófilos no sangue pode ocorrer na síndrome de Cushing, em infeções da corrente. Porém esta diminuição, geralmente não causa problemas, pois outras partes do sistema imunológico compensam adequadamente.
Basófilo	Basófila	O aumento do número de basófilos pode ocorrer em pessoas com hipotireoidismo e distúrbios mieloproliferativos.
	Basópenia	A redução do número de basófilos normalmente ocorre em pessoas com hipertireoidismo, reações de hipersensibilidade aguda e infeções.

Em suma, a maioria das infeções e distúrbios inflamatórios resulta em alterações na quantidade de leucócitos, que variam consoante o tipo de distúrbio ou infeção, bem como o estado de saúde geral do paciente.

3.2.4 - PLAQUETAS

As plaquetas ou trombócitos são fragmentos celulares que circulam na corrente sanguínea e se desenvolvem a partir de megacariócitos, células precursoras da medula óssea [39; 44]. Os trombócitos formam agregados que, juntamente com fatores de coagulação humoral, fecham as lesões vasculares. Durante o processo de agregação, além da função mecânica, os grânulos trombocitários também libertam fatores que promovem a coagulação. Os fatores hemostáticos regulam o aumento de megacariócitos e a liberação de trombócitos (por exemplo, sangramento ou aumento da degradação de trombócitos) [39; 44].

A avaliação do número de plaquetas e do volume médio plaquetário através do plaquetograma, permite detetar possíveis distúrbios plaquetários como a: trombocitose (aumento do número de plaquetas), trombocitopenia (diminuição do número de plaquetas) e a presença de plaquetas grandes em circulação. Estas alterações e distúrbios são apresentados na tabela 9.

Tabela 9 - Alterações plaquetárias e quadro clínico associado [44].

Alterações plaquetárias	Quadros clínicos ou distúrbios associados
Trombocitose	O aumento excessivo quando ao número de plaquetas pode resultar da produção excessiva de plaquetas em resposta a uma patologia (infecções agudas, doenças inflamatórias, entre outras).
Trombocitopenia	A diminuição do número de plaquetas pode ocorrer devido a um aumento do gasto ou destruição das plaquetas, resultando de causas imunológicas ou da utilização de certos medicamentos.
Aumento do volume	O aumento do volume plaquetário tem vindo a ser associado a distúrbios relacionados com a produção de plaquetas (megacariocitopoiese e a trombopoiese) nomeadamente ao aumento do número de cromossomas no núcleo dos megacariócitos (ploidia). Além disso, este índice está aumentado em pacientes com enfarte do miocárdio ou acidente vascular cerebral.

Qualquer alteração plaquetária apontada pelo equipamento deve ser confirmada em esfregaço sanguíneo, pois certos tipos de alterações como a trombocitopenia e o aumento do volume plaquetário podem ser resultado de agregações plaquetárias. Se esse for o caso deve-se fazer nova colheita em tubo de citrato trissódico, que reduz a agregação plaquetária, para efetuar a análise plaquetária, de forma a confirmar a quantidade de plaquetas.

3.2.5 - VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO ERITROCITÁRIA

A velocidade de sedimentação eritrocitária é um teste simples e de baixo custo, onde é avaliada a sedimentação dos eritrócitos numa coluna vertical durante 60 minutos à temperatura ambiente (Figura 29) e sem qualquer efeito mecânico [45]. O teste é normalmente utilizado na monitorização de doenças inflamatórias (especialmente na artrite reumatoide). Porém, é um teste inespecífico, visto que nenhuma patologia específica pode ser excluída ou diagnosticada em pacientes ditos saudáveis. Mesmo assim, em pacientes com doença inespecífica que apresentam uma velocidade de sedimentação aumentada, este teste pode indiciar a eventual presença de uma doença ainda não diagnosticada [45].

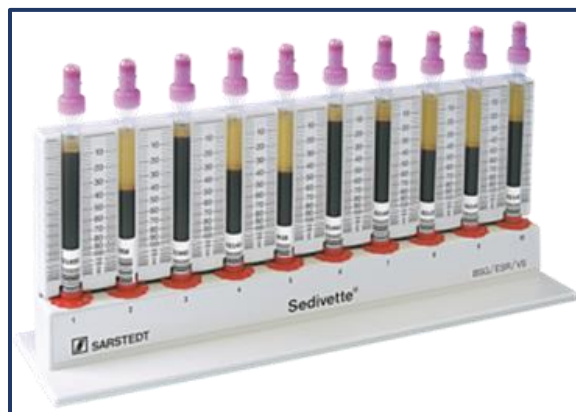


Figura 29 - Suporte para determinar a velocidade de sedimentação (fonte: <https://www.sarstedt.com/pt/produtos/diagnostico/hemossedimentacao/sistemas-de-coleta-de-sangue/>).

3.2.6 - COAGULAÇÃO

A hemostasia é o processo fisiológico que suspende a hemorragia (sangramento) no local de uma lesão, mantendo o fluxo sanguíneo normal em outras partes da circulação. Esta requer atividade combinada de fatores vasculares, plaquetas e fatores de coagulação [46].

A coagulação trata-se uma sequência complexa de reações químicas que culminam na formação de um coágulo no local de lesão do vaso sanguíneo.

No laboratório de Hematologia e Coagulação são analisados os fatores de coagulação e as plaquetas, sendo que estas medições laboratoriais representam uma aproximação ao estado hemostático do corpo.

Relativamente aos fatores de coagulação, estes são avaliados através de 3 exames [47]:

- **tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT)**– permite avaliar a via intrínseca da cascata de coagulação, mais concretamente os fatores XII, XI, IX, VIII, X. O resultado reflete o tempo que demora até à formação do coágulo.
- **tempo de protrombina (PT)** – permite avaliar a via extrínseca da cascata de coagulação, nomeadamente os fatores VII, X, V, II. O resultado reflete o tempo que demora até à formação do coágulo.
- **dosagem do fibrinogénio** – utilizado para determinar disfunções hepáticas e problemas cardiovasculares. Para esta determinação é adicionada trombina ao meio convertendo o fibrinogénio em fibrina (etapa final da coagulação), permitindo determinar a quantidade de fibrinogénio funcional.

3.2.7 - ATIVIDADE DO D-DÍMERO

A atividade do D-dímero é um teste especial, classicamente usado para excluir patologias (resultado negativo) associadas à coagulação.

Entre elas, a:

- Coagulação intravascular disseminada (CID) - envolve produção anormal e excessiva de trombina e fibrina no sangue circulante [48];
- Trombose venosa profunda (TVP) - é a coagulação do sangue em uma veia profunda que ocorre mais comumente nos membros inferiores ou pelve e é a causa principal de embolia pulmonar [49];
- Embolia pulmonar (EP) - é a oclusão de uma ou mais artérias pulmonares por trombos que se originam de outro local, classicamente de veias de grosso calibre ou da pelve [50].

Se o teste do D-dímero resultar em positividade é confirmado a patologia em ecografia.

3.3 - ROTINA LABORATORIAL

De forma a garantir a fiabilidade dos resultados proporcionados pelos equipamentos todos os dias ao início do dia são efetuados os controlos de qualidade e a sua manutenção. Além disso, ao longo do dia é importante verificar se os equipamentos possuem os reagentes necessários à execução das análises.

3.3.1 - HEMATOLOGIA

Após chegada das amostras de sangue (provenientes de pacientes do internamento, serviço de urgência Hospital de dia, consulta externa e centros de saúde da área Barcelos e Esposende) ao laboratório, os tubos de sangue com EDTA (anticoagulante utilizado para efetuar hemograma) são colocados no equipamento de contagem, diferenciação e avaliação das células sanguíneas, “UniCel® DxH 600 Coulter® Cellular Analysis System” ilustrado na figura 30.



Figura 30 - UniCel® DxH 600 Coulter® Cellular Analysis System.

Ao longo do dia é feita a validação dos resultados pelo técnico (TSDT) à medida que estes entram no sistema informático. Caso haja uma incongruência nos resultados, quando comparados com o historial clínico do doente, é feita a repetição da análise para ter a certeza que os resultados estão corretos.

Quando o equipamento deteta alguma alteração significativa de algum dos parâmetros referenciados anteriormente, é efetuado o esfregaço sanguíneo. Por vezes o médico também pode requer, a avaliação do esfregaço sanguíneo que é feita após o hemograma, teste que irá auxiliar na interpretação da observação microscópica do esfregaço.

3.3.2 - COAGULAÇÃO

Após a chegada das amostras de sangue colhidas em tubo de citrato trissódico (anticoagulante), ao laboratório, segue-se a respetiva centrifugação a 3500 rotações por minuto durante 15 minutos. De seguida são encaminhadas para o equipamento Sysmex CA-600 Systems (figura 31), onde são avaliados os parâmetros de coagulação requeridos para cada uma das amostras. Os resultados obtidos pelo equipamento são depois validados por um TSDT, tendo em atenção o historial clínico do paciente. Caso haja uma diferença grande entre os

resultados e o historial, os valores são confirmados com novas análises, sabendo que o tempo limite para efetuar a análise de coagulação é de 4 horas após a colheita.



Figura 31 - Sysmex CA-600 Systems

CAPÍTULO 4 - IMUNOQUÍMICA

O estágio na área de Imunoquímica, decorreu de 14 de Janeiro de 2019 a 22 de Março de 2019, sobre a coordenação da Dr.^a Filomena Reis.

Proporcionou o contacto com os vários equipamentos e metodologias que englobam o laboratório de imunoquímica, nos quais são efetuadas análises para a determinação de vários analitos importantes na monitorização ou determinação de variadas patologias. Porém, algumas análises imunoquímicas não são efetuadas no laboratório pois, como são raramente requeridas, o equipamento ou metodologia a elas dedicado implicaria uma despesa excessiva, sendo por isso enviadas para entidades externas.

Neste capítulo são descritos os métodos, materiais e equipamentos utilizados nas áreas da Imunoquímica no SPC, assim como os parâmetros avaliados neste laboratório.

4.1 - MATERIAIS E METODOLOGIAS

De forma a auxiliar o diagnóstico médico e permitir a monitorização de variados parâmetros bioquímicos, imunológicos e farmacocinéticos, o laboratório de imunoquímica encontra-se equipado de equipamentos e metodologias capazes de efetuar de forma rápida e eficaz uma gama variada de análises clínicas.

4.1.1 - PROTEINOGRAMA POR ELETROFORESE

A eletroforese de proteínas é uma técnica bem estabelecida, rotineiramente usada em laboratórios clínicos para triagem de amostras para detetar anormalidades proteicas [51]. No SPC o equipamento utilizado é MINICAP (Thermo Fisher Scientific), ilustrado na figura 32.



Figura 32 - MINICAP (sistema capilar de eletroforese).

O ensaio MINICAP PROTEIN (E) 6 é baseado no princípio da eletroforese capilar em solução livre. As proteínas séricas são separadas num tampão alcalino em seis frações num capilar de sílica através de um fluxo eletro-osmótico de alta voltagem, devido à sua mobilidade eletroforética. A figura 33 mostra um exemplo de uma eletroforese e as frações correspondentes a cada zona do gráfico obtido no equipamento [51].

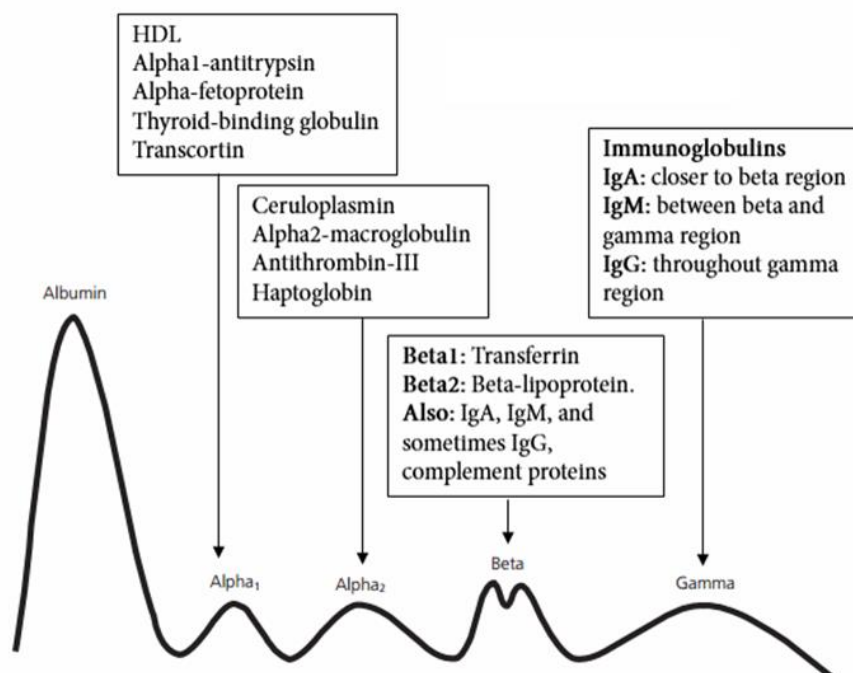


Figura 33 - Proteinograma por eletroforese e frações correspondentes (fonte: <https://epomedicine.com/medical-students/m-spike/>).

As proteínas são diretamente detetadas durante a migração pela absorvância lida na zona da radiação ultravioleta (UV). Cada fração contém uma ou mais proteínas.

4.1.2 - ANÁLISE *IN VITRO* DE URINA

A análise bioquímica da urina é executada no equipamento Urisys 2400 (Roche), representado na figura 34, destinado à determinação, *in vitro*, qualitativa ou semi-quantitativa de analitos da urina. Este analisador utiliza “cassetes” contendo 400 tiras de testes, cada uma delas contendo 10 bandas reativas individuais, correspondendo uma tira a uma amostra. Quando uma tira é distribuída para utilização, uma alíquota de amostra de urina é depositada em cada

uma das bandas reativas. Os resultados dos testes baseiam-se na leitura da intensidade de luz refletida [52].



Figura 34 - Urisys 2400.

Uma luz “*Light Emitting Diode*” (LED) com um comprimento de onda definido, presente no interior do analisador, incide luz, com um comprimento de onda definido, na superfície da banda reativa. Essa luz é refletida, com uma intensidade que é proporcional à cor da banda reativa, sobre um detetor de foto díodo, situado diretamente acima da banda reativa. Esse detetor transmite um sinal elétrico analógico que é convertido em sinal digital. Os dados recolhidos são depois transmitidos ao sistema informático [52].

4.1.3 - ANÁLISES FOTOMÉTRICAS E IMUNOENSAIOS

Para a determinação da maioria dos parâmetros bioquímicos, imunológicos e farmacocinéticos são utilizados os equipamentos da gama Cobas (Roche). Sendo estes:

- **Cobas 6000** (figura 35) - é um sistema automatizado destinado a análises bioquímicas, por fotometria, com uma unidade ISE (de elétrodos seletivos de iões) que permite determinar a concentração de iões; o sistema também efetua imunoensaios por eletroquimioluminescência [53].



Figura 35 - Cobas 6000.

- **Cobas Integra 400 plus** (figura 36) - é um sistema automatizado capaz de analisar parâmetros bioquímicos, determinar a concentração de iões, sendo também capaz de monitorizar fármacos, aspeto extremamente importante para perceber a dinâmica do fármaco no organismo do paciente, informando assim o médico da necessidade de regular a dose, análise maioritariamente pedida para doentes internados [53].



Figura 36 - Cobas Integra 400 plus.

- **Cobas e 411** (figura 37) - analisador automatizado que permite fazer análises quantitativas e qualitativas, através de imunoensaios *in vitro* por eletroquimioluminescência, de uma ampla gama de marcadores bioquímicos [53].



Figura 37 - Cobas e 411.

4.1.4 - IONOGRAMA POR ELÉTRODOS SELETIVOS DE IÕES (ISE)

O ionograma permite determinar a concentração dos iões de sódio (Na^+), potássio (K^+) e cloreto (Cl^-) em soro, plasma ou urina, utilizando elétrodos seletivos de iões. Estes iões estão envolvidos na maior parte das principais funções metabólicas do organismo. É usado para diagnosticar desequilíbrios eletrolíticos ou ácido-base e monitorizar o efeito do tratamento num desequilíbrio existente. Este exame é efetuado pelo equipamento Cobas 6000 e pelo Cobas Integra 400 *plus*, já referidos [53].

4.1.5 - IMUNOENSAIOS DE MICROPARTÍCULAS

Os imunoensaios de micropartículas são efetuados num analisador automatizado, Architect *plus i 2000*_{SR} da Abbott (figura 38), que processa amostras de soro, plasma ou urina, utilizando o método de imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência [54]. Este método baseia-se na utilização de micropartículas paramagnéticas revestidas com uma molécula de captura (antigénio, anticorpo ou partícula viral) específicas para a medição do analito que pretendemos medir [54].



Figura 38 - Architect *plus i* 2000_{SR}

O equipamento começa por incubar parte da amostra com micropartículas paramagnéticas, o que induz a ligação das micropartículas ao analito específico formando um complexo imunitário. De seguida, é feita uma lavagem para remoção do excesso de micropartículas não combinadas. Após esta lavagem, é adicionado um conjugado de acridínio que se liga ao complexo imunitário. É feita uma nova lavagem para remoção dos materiais não combinados. Por fim, são adicionadas uma solução pré-ativadora, que separa o acridínio, e uma solução ativadora que vão provocar a reação de quimioluminescência, em que a medição da luz é efetuada pelo sistema ótico do equipamento de modo a quantificar a concentração do analito [54].

4.1.6 - TESTES A ALERGIAS

Para efetuar testes de alergias é utilizado o sistema automatizado Unicap^E 100 (Thermo Fisher Scientific, representado na figura 39, que permite a quantificação de imunoglobulinas E específicas [55]. Neste teste utiliza-se o soro.



Figura 39 - Unicap 100.

No SPC as imunoglobulinas E específicas analisadas são: aos ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus* e *Dermatophagoides farinae*), pó da casa, algodão, fungos, trigo, pelo e caspa de gato, pelo e caspa de cão, camarão, mexilhão, clara de ovo e leite.

4.1.7 - TÉCNICAS MANUAIS

No SPC são efetuadas várias técnicas manuais recorrendo a *kits* rápidos para análise imunoquímica, tais como:

- Pesquisa de drogas de abuso - imunoensaio cromatográfico de fluxo lateral para a deteção qualitativa de múltiplas drogas e metabolitos na urina [56].
- Pesquisa de anticorpos anti-*Treponema pallidum* - teste para a determinação de anticorpos anti-*Treponema pallidum* por hemaglutinação indireta para diagnóstico sorológico da Sífilis no soro e LCR [57].
- Pesquisa de HRPII e pLDH - teste qualitativo, rápido e diferencial para a deteção da proteína II rica em histidina (HRPII) específica para *Plasmodium falciparum* e da desidrogenase láctica do *Plasmodium* (pLDH) específica para as espécies de *Plasmodium* em amostras de sangue [58].
- Teste de gravidez – permite a deteção precoce da gravidez, analisando na urina a presença da gonadotrofina coriônica humana (hCG), que é uma hormona produzida pela placenta logo após a conceção [59].
- Teste para diagnóstico de mononucleose infecciosa (MI) – deteção de anticorpos heterofilos de mononucleose infecciosa em sangue total [60].
- Teste para deteção de anticorpos IgM anti-*Leptospira* – imunoensaio para deteção qualitativa de anticorpos IgM anti-*Leptospira* em sangue total [61].

4.2 - PARÂMETROS DE ANÁLISE

No laboratório de imunoquímica do SPC são diariamente analisados vários parâmetros bioquímicos, imunológicos e farmacocinéticos. De seguida são descritos estes parâmetros referindo também possíveis patologias associadas aos valores obtidos.

4.2.1 - URINA TIPO II

A urina tipo II é um exame de rotina cujo objetivo é avaliar os parâmetros bioquímicos da urina, assim como indícios presentes na observação microscópica do sedimento urinário. Este exame é de extrema importância pois permite monitorizar e controlar a diabetes *mellitus*, avaliar o funcionamento dos rins e auxiliar no diagnóstico de infeções e de outras patologias. Além disso trata-se de um exame laboratorial simples e de baixo custo.

4.2.1.1 - ANÁLISE BIOQUÍMICA

A análise bioquímica *in vitro* de urina é efetuada no Urysis 2400[®] Roche (referido anteriormente), um sistema totalmente automatizado, que permite a determinação qualitativa e semi-quantitativa de analitos de urina, incluindo pH, leucócitos, nitritos, proteínas, glucose, cetonas, urobilinogénio, bilirrubina, eritrócitos e densidade específica através de tiras teste com 10 bandas reativas, assim como a cor e o aspeto [52].

A alimentação, o funcionamento dos rins e qualquer descompensação, distúrbio ou doença podem afetar a aparência normal da urina. Estas alterações podem ser constatadas nos parâmetros avaliados por este exame. A tabela 10 descreve o significado clínico de cada um dos parâmetros avaliados.

Tabela 10 - Parâmetros avaliados no exame de urina tipo II e o seu significado clínico [62-63]

Parâmetros	Significado clínico
pH	Ajuda a detetar possíveis distúrbios urinários ou distúrbios eletrolíticos sistémicos de origem metabólica ou respiratória.
Leucócitos	A sua presença na urina é um indicador de uma possível infeção.
Nitritos	A sua presença na urina é um forte indício de uma infeção bacteriana no trato urinário, determinando assim a necessidade de efetuar uma urocultura.

Proteínas	É um bom indicador para apurar possíveis alterações da fisiologia renal.
Glucose	É fundamental na deteção e no controlo da diabetes <i>mellitus</i> . A glucose na urina também poderá ser um indicador de doenças que afetam a reabsorção tubular.
Corpos cetónicos	São produtos da metabolização das gorduras, podem estar presentes na urina quando: há incapacidade de metabolizar os hidratos de carbono (ex. na diabetes <i>mellitus</i>) e quando há ingestão insuficiente ou perda de hidratos de carbono.
Urobilinogénio	Este pigmento biliar pode ser sugestivo: de alteração hepática porque diminui a capacidade do fígado de processar o urobilinogénio; ou de distúrbios hemolíticos, isto é, destruição massiva dos eritrócitos que leva ao aumento da bilirrubina que por sua vez leva ao aumento de urobilinogénio que é filtrado pelo rim.
Bilirrubina	A bilirrubina conjugada surge na urina quando o seu ciclo normal de degradação é suspenso por doenças hepáticas e biliares.
Eritrócitos	Tem maior relação com distúrbios de origem renal ou urogenital (ex. cálculos renais, pielonefrite, doenças glomerulares), mas também poderá ser provocado por anemias hemolíticas, infeções e reações transfusionais.
Densidade específica	É definida em comparação com a densidade de um mesmo volume de água destilada à mesma temperatura. A densidade baixa pode representar uso excessivo de líquidos, até diabetes e hipertensão. Já a densidade alta pode ser indicativa de desidratação, insuficiência cardíaca, etc.
Cor	A coloração da urina pode ir desde a ausência de cor até ao negro. Esta variação na cor pode ser fisiológica ou patológica. Por norma esta deve ser levemente amarelada.
Aspeto	Refere-se à transparência da amostra, sendo que por norma o é. As principais causas de aspeto turvo são a precipitação de cristais amorfos, leucócitos, hemácias, células epiteliais e bactérias.

4.2.1.2 - ANÁLISE MICROSCÓPICA

A análise bioquímica por sistema automatizado, indicara a necessidade de proceder à análise microscópica. Quando tal acontece, após a análise bioquímica, a amostra de urina é centrifugada a 2000 rotações por minuto durante 5 minutos. O sobrenadante é descartado e procede-se à ressuspensão do sedimento em aproximadamente 1 mL da própria urina. O sedimento obtido é então observado ao microscópio ótico através de uma lâmina de sedimentação urinária colocando uma gota da suspensão num dos campos da lâmina (figura 40).

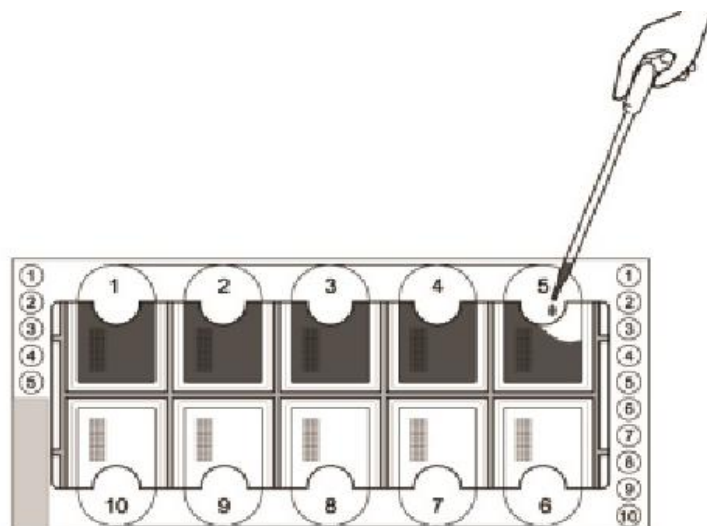


Figura 40 - Lâmina K-Cell utilizada na análise microscópica do sedimento urinário (fonte: <https://kasvi.com.br/analises-clinicas-urinalise/>).

A análise microscópica da urina tem como objetivo detectar e identificar substâncias insolúveis presentes na amostra. Algumas dessas substâncias só têm significado clínico em determinadas quantidades, sendo a sua quantificação de extrema importância. De seguida encontram-se descritos os elementos que são quantificados:

- **Células Epiteliais** - As células epiteliais são elementos comuns no sedimento urinário, a maioria não tem significado clínico quando provenientes dos tecidos de revestimento do sistema urogenital. No caso de serem células do epitélio tubular renal podem indicar necrose tubular ou isquemia renal [64].
- **Cristais** - Alterações no pH, temperatura e concentração de sais podem levar à formação de cristais na urina. A presença destes cristais pode indicar distúrbios hepáticos, erros inatos do metabolismo ou cristalização de origem medicamentosa nos túbulos podendo levar à sua lesão. Os cristais são geralmente classificados como ácidos ou alcalinos de acordo com o pH da urina em que estão presentes, como ilustrado na figura 41 [64].

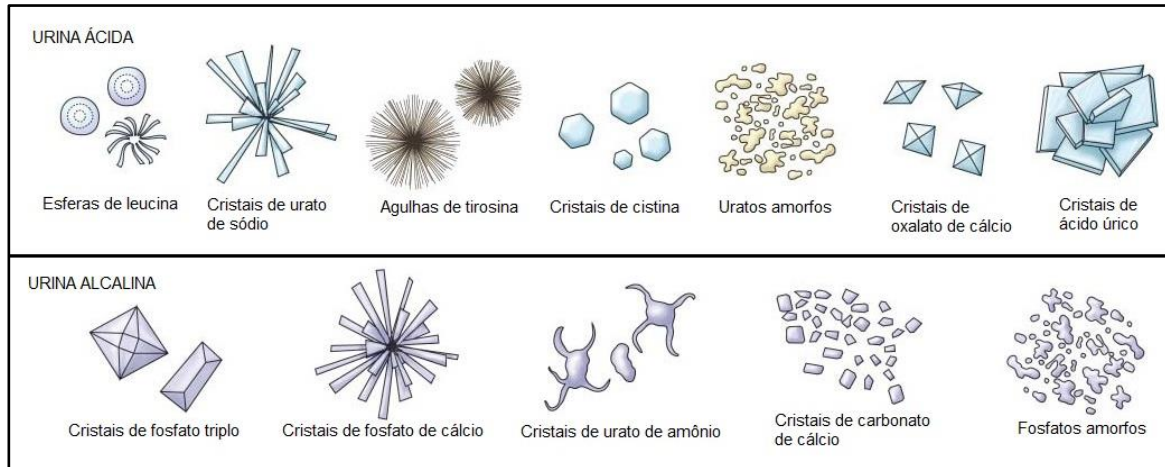


Figura 41 - Morfologia dos cristais urinários (fonte: https://www.medicinanet.com.br/m/conteudos/acp-medicine/4822/abordagem_do_paciente_com_doenca_renal_-_biff_f_palmer_md_facp.htm).

- **Cilindros** - Os cilindros são elementos excretados pelas células dos túbulos renais, cujo o principal componente é a proteína de Tamm-Horsfall (THP). Estes retêm o conteúdo dos túbulos renais no momento da sua formação. Dessa forma, os cilindros funcionam como biomarcadores da lesão renal dando indícios sobre o local e a natureza da lesão. A figura 42 seguinte mostra os tipos de cilindros mais comuns [64].

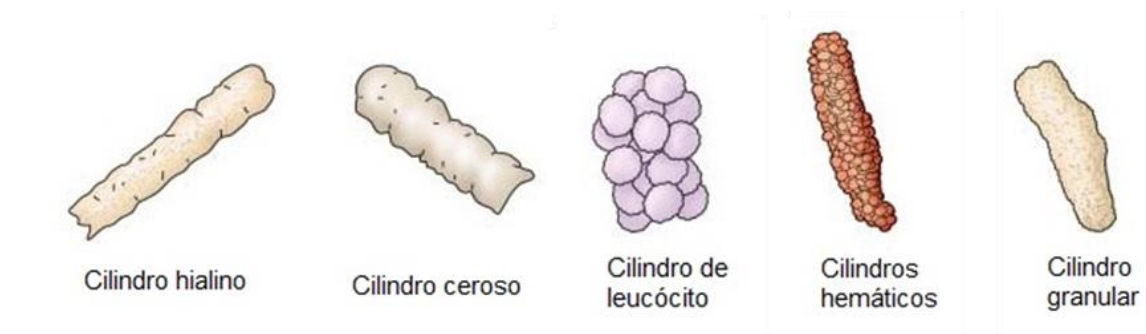


Figura 42 - Morfologia dos cilindros (fonte: https://www.medicinanet.com.br/m/conteudos/acp-medicine/4822/abordagem_do_paciente_com_doenca_renal_-_biff_f_palmer_md_facp.htm).

- **Eritrócitos e Leucócitos** - A presença de número elevado de eritrócitos e leucócitos na urina pode indicar lesões e inflamações a nível dos rins ou das vias urinárias. A sua morfologia pode ser útil na localização da origem da lesão [64].

4.2.2 - MARCADORES VÍRICOS

Os marcadores víricos, analisados por imunoensaios de micropartículas, servem para determinar a presença de um vírus ou para determinar a fase da doença em que o paciente se encontra, e ainda se este está a produzir anticorpos contra o vírus. A determinação destes parâmetros é efetuada no ARCHITECT plus i 2000SR (referido anteriormente). No SPC são analisados alguns marcadores víricos para a Hepatite B, Hepatite C e VIH.

Quanto à Hepatite B os marcadores analisados são [65]:

- **AgHBs** (Antigénio de superfície do vírus da hepatite B) - É o 1º marcador a surgir: entre os 7 e os 20 dias antes da sintomatologia e a sua presença traduz sempre a presença de infeção;
- **Ac Anti-HBs** (Anticorpo para o Antigénio HBs) - Surge no soro 1 a 3 meses após a vacinação ou na fase de resolução da infeção aguda. Títulos ≥ 10 UI /mL conferem imunidade após vacinação (idealmente deverão ser ≥ 100 UI /mL um a três meses após a última dose da vacina);
- **AgHBe** (Antigénio de replicação viral) - Detetável no soro em fases de replicação viral. Na fase aguda, desaparece pouco depois do início da sintomatologia;
- **Ac Anti-HBe** (Anticorpo para o Antigénio HBe) - Na situação de infeção aguda surge pouco tempo após a perda do AgHBe e indica redução da infeciosidade. Este anticorpo está normalmente presente nos portadores inativos do vírus;
- **AgHBc** (Antigénio core) – Nem sempre é detetado no soro. Está presente quer na fase aguda da doença quer na fase crónica;
- **Ac Anti-HBc IgM** (Anticorpo da classe IgM para o Antigénio HBc) - É o marcador que permite diagnosticar uma infeção aguda. Surge depois do AgHBs, coincidindo com o início da sintomatologia. Pode ser o único marcador no soro no “período de janela” de uma infeção aguda, isto é, quando o AgHBs já não se deteta e o Ac Anti-HBs ainda não é produzido em quantidade suficiente para ser detetado.

Quanto à Hepatite C só o marcador Anti-VHC (Anticorpo para o Vírus da Hepatite C total) é analisado e surge entre 15 dias e 6 meses após a infeção. Quando é positivo pode corresponder a infeção no presente ou no passado. Se o teste for positivo deve fazer-se a pesquisa do RNA viral [65].

Quanto ao VIH (Vírus da Imunodeficiência Humana), este é analisado através do marcador Ag/Ac Combo, que permite a deteção do antígeno p24 (presente no capsídeo) do VIH e deteção dos anticorpos contra o VIH-1 e/ou VIH-2 em soro ou plasma [66].

4.2.3 - MARCADORES TUMORAIS

Os marcadores tumorais, analisados por imunoensaio de micropartículas (ARCHITECT plus i 2000SR), são substâncias produzidas pelo organismo ou pelo próprio tecido cancerígeno em resposta ao crescimento de tumores, podem ser detetados no sangue, urina ou amostras de tecido. A tabela 11 refere os marcadores tumorais analisados no SPC.

Tabela 11 - Marcadores tumorais analisados no SPC [67-72].

Marcador tumoral	Descrição
CA 125 (antígeno hidrato de carbono 125)	- Permite o diagnóstico de cancro de ovário, com grau de confiança de 80% a 85%. - Permite o diagnóstico de cancro epitelial, em que o grau de confiança é proporcional a fase da doença.
CA 15-3 (antígeno hidrato de carbono 15-3)	- Utilizado como meio auxiliar na gestão do tratamento de pacientes com cancro da mama nos estágios II e III. - Não é suficientemente sensível ou específico para ser considerado um exame para triagem de cancro da mama.
CA 19-9 (antígeno hidrato de carbono 19-9)	- O ensaio é baseado num anticorpo monoclonal que reage com um determinado antígeno associado a tumores (normalmente malignidades gastrointestinais).
CEA (antígeno carcinoembrionário)	- Glicoproteína utilizada principalmente para monitorizar o tratamento de pacientes com cancro (retal, pulmão, mama, fígado, pâncreas e ovário).
PSA (antígeno prostático) total + livre	- Aumentado na hiperplasia benigna da próstata, prostatite, infeção urinária e com a idade.
β2-microglobulina	- Está presente na maioria dos líquidos corporais e aumentada no sangue de indivíduos com cancro como mieloma múltiplo, leucemia e linfoma e também em processos inflamatórios.

4.2.4 - MARCADORES DE DOENÇAS CONGÉNITAS

O foco destes marcadores é determinar a presença anticorpos de vírus ou parasitas que podem-se desenvolver durante o desenvolvimento embrionário, provocando deformações estruturais ao feto. Em seguida serão abordados os marcadores de doenças congénita analisados por imunoensaio de micropartículas (ARCHITECT plus i 2000SR) no SPC.

Para determinar a presença do *Rubella virus* são analisados os seguintes marcadores:

- **Rubella IgG** - permite a determinação quantitativa e deteção qualitativa de anticorpo IgG contra o vírus da rubéola em soro e plasma humano [73].
- **Rubella IgM** (detetável até aos 180 dias) - permite a determinação quantitativa e deteção qualitativa de anticorpo IgM contra o vírus da rubéola em soro e plasma humano [74]

A tabela 12 relaciona o resultado do exame da rubéola e o seu significado clínico.

Tabela 12 - Resultado do exame da Rubéola e o seu significado clínico [73-74].

Resultado do exame		Significado clínico
<i>Rubella IgM</i>	<i>Rubella IgG</i>	
Positivo	Negativo	Infeção recente.
Negativo	Positivo	Infeção antiga curada ou vacinação.
Positivo	Positivo	Resultado inconclusivo, sendo necessário efetuar teste de avidéz.
Negativo	Negativo	Não ocorreu contacto com o vírus da Rubéola.

No caso de suspeita de infeção por *Toxoplasma gondii* são analisados os seguintes marcadores:

- **Toxo IgM** - permite a deteção qualitativa de anticorpo IgM contra o *T. gondii* em soro e plasma humano. Os anticorpos IgM são detetados em indivíduos que contraíram recentemente a infeção, mas podem persistir durante um período máximo de 18 meses após a infeção [75].

- **Toxo IgG** - permite a deteção qualitativa de anticorpo IgG contra o *T. gondii* em soro e plasma humano. A presença de anticorpos IgG indica que ocorreu infeção, mas não distingue se é recente ou passada. Para distinguir uma infeção antiga de uma recente, as amostras positivas para anticorpos IgG e IgM devem ser analisadas com o teste de avidez da IgG, que determina há quanto tempo persiste a doença, de forma a determinar se esta é prejudicial para o feto [76].

Para avaliar uma possível infeção por *Cytomegalovirus* (CMV) são analisados os seguintes marcadores:

- **CMV IgG e CMV IgM** - permite a deteção qualitativa de anticorpos IgG e IgM em soro e plasma humano. No caso de infeção pelo CMV, os primeiros anticorpos do tipo IgM surgem dentro de 2 semanas e podem demorar até 12 meses a desaparecer. Os primeiros anticorpos IgG surgem 3 semanas após a infeção, vai aumentando a concentração durante algumas semanas e depois estabiliza [77-78].

4.2.5 - MARCADORES DA FUNÇÃO HEPATOBILIAR

Os marcadores da função hepatobiliar avaliam o funcionamento do fígado e das vesículas biliares, a sua determinação é efetuada por fotometria e por imunoensaio (Cobas 6000; Cobas e 411; Cobas 400 Integra *plus*). Estes também podem ser úteis para diagnosticar outras doenças quando comparados com outros parâmetros fisiológicos. Os marcadores analisados no SPC são:

- **Albumina** - é uma proteína produzida no fígado que se encontra presente no plasma e que impede a saída de água dos vasos sanguíneos, transporta hormonas, vitaminas, medicamentos e outras substâncias. A sua quantidade diminui quando existem doenças hepáticas e renais que causam síndrome nefrótica, e quando há desnutrição. Pode aumentar em caso de desidratação [79-80].
- **Alanina aminotransferase** - é uma enzima encontrada principalmente no fígado podendo também estar presente nos rins, coração e músculos. Em condições normais os níveis desta enzima no sangue são baixos, porém quando há uma lesão hepática

esta é libertada para a corrente sanguínea, mesmo antes de aparecerem sintomas visíveis, como a icterícia [80-81].

- **Aspartato aminotransferase** - é uma enzima presente em todo o corpo, mas encontra-se em maior quantidade no fígado. Quando ocorre uma lesão a nível das células hepáticas esta enzima é libertada para a corrente sanguínea [80; 82].
- **Bilirrubina** – para analisar a bilirrubina são efetuados 2 testes em conjunto (bilirrubina total e direta). A bilirrubina total mede toda a bilirrubina no sangue e a bilirrubina direta mede a forma conjugada (combinada a outro composto). A bilirrubina total encontra-se aumentada em anemias hemolíticas ou casos de deficiência na captação ou conjugação hepática, enquanto que o aumento da bilirrubina conjugada representa uma possível obstrução das vias biliares, impedido a excreção biliar [80].
- **γ -glutamilttransferase** – é uma enzima que aumenta em situações de doença hepatobiliar, principalmente na colestase. Além disso, a ingestão de álcool e algumas drogas podem estimular os microssomas hepáticos, aumentando em grande escala a quantidade de γ -glutamilttransferase, limitando assim a sua especificidade [80].
- **α_1 -fetoproteína** – é uma glicoproteína sintetizada de forma normal no saco vitelino durante a vida embrionária e pelo fígado dos fetos, só se encontra elevada em neonatos e em gestantes. Esta enzima decresce de forma rápida durante o primeiro ano de vida. Um ligeiro aumento aponta para um diagnóstico de carcinoma hepatocelular, sendo que quanto maior for a concentração desta enzima maior será o tamanho do tumor, grau de diferenciação e presença de metástases [80].
- **Amónia** - é uma substância produzida por bactérias intestinais e por células do corpo durante a degradação de proteínas e, normalmente, é transportada para o fígado, onde é transformada em ureia e glutamina. A ureia é transportada para os rins sendo excretada na urina. Se a amónia não for toda transformada em ureia, acumula-se no sangue e atravessa a barreira hematoencefálica. No cérebro, a amónia e outros compostos normalmente metabolizados pelo fígado podem-se acumular, causando a encefalopatia hepática provocando alterações mentais e neurológicas que incluem desorientação, sonolência e, em casos graves, coma e morte. Problemas no

processamento da amónia podem ocorrer por doenças hepáticas, insuficiência renal ou quando há dificuldade no transporte ou metabolização da amónia [80; 83].

4.2.6 - MARCADORES DA FUNÇÃO PANCREÁTICA

Para a avaliação da função pancreática é determinada a concentração da α -amílase e a lipase, duas enzimas produzidas no pâncreas, por análise fotométrica (pelos equipamentos Cobas 6000 e Cobas 400 Integra *plus*). Estas enzimas aumentam no primeiro dia de uma pancreatite aguda, voltando ao normal após 3 a 7 dias. A quantificação destas enzimas permite diagnosticar e monitorizar pancreatites e outras doenças pancreáticas [84].

4.2.7 - MARCADORES DA FUNÇÃO RENAL

A função renal é avaliada a partir da quantificação da creatinina em exames sanguíneos e urinários. A concentração de creatinina presente no sangue depende do rácio entre a quantidade formada e a sua depuração renal. A taxa de formação da creatinina é proporcional à massa muscular do indivíduo. O consumo de algumas drogas e de grande quantidades de carne podem levar ao aumento do seu valor no sangue [85].

A creatinina também pode ser avaliada em conjunto com a ureia, ambas por análise fotométrica (pelos equipamentos Cobas 6000 e Cobas 400 Integra *plus*), como análise de rotina ou para monitorização de doenças renais, ou outras doenças que possam comprometer os rins como a diabetes. Esta avaliação é por vezes efetuada antes, e durante, certos tratamentos que possam prejudicar a função renal [85].

4.2.8 - MARCADORES DE LESÃO MUSCULAR

A presença de uma lesão muscular ou de outros tecidos é determinada por análise fotométrica (pelos equipamentos Cobas 6000 e Cobas 400 Integra *plus*), para este efeito são avaliadas duas enzimas:

- **Lactato desidrogenase (LDH ou DHL)** - é uma enzima encontrada em quase todos os tecidos do corpo, mas apenas uma pequena quantidade é detetada no

sangue. A principal utilização da LDH é como um indicador geral da existência de um dano tecidual grave (podendo este ser agudo ou crónico) [86].

- **Creatina-quinase (CK)** – é uma enzima encontrada no coração, cérebro, músculos esqueléticos e em outros tecidos. Os níveis sanguíneos da CK aumentam quando há uma lesão nos músculos esqueléticos ou no músculo cardíaco. Este exame é frequentemente efetuado em pessoas com dor torácica ou com outros sintomas de enfarte do miocárdio [87].

4.2.9 - MARCADORES CARDÍACOS

De forma a avaliar o estado do músculo cardíaco efetua-se a quantificação sérica de proteínas e péptidos específicos que em conjunto nos permitem precisar um diagnóstico. Abaixo encontram-se descritos os marcadores que permitem esta avaliação, sendo que estes são analisados por fotometria (pelos equipamentos Cobas 6000 e Cobas 400 Integra *plus*):

- **Creatina quinase MB (CK-MB)** - forma de creatina quinase encontrada principalmente no coração. Os níveis de CK-MB no sangue aumentam nas primeiras 4 a 6 horas após o enfarte do miocárdio, atingem o valor máximo em 18 a 24 horas e voltam ao normal em 2 a 3 dias [88].
- **Troponina I** – a avaliação sérica da troponina I é principalmente usada para avaliar um possível enfarte do miocárdio ou outra lesão cardíaca. A troponina é dos marcadores cardíacos que permanece em concentrações elevadas por mais tempo, além de ser mais específica que a CK-MB e a mioglobina, pois estas podem resultar em positividade também em lesões do músculo esquelético [89].
- **Mioglobina** – a análise da mioglobina é usada em conjunto com a da troponina para diagnosticar ou excluir enfarte do miocárdio. Duas a três horas após um enfarte ou outra lesão muscular, os níveis de mioglobina no sangue aumentam, atingindo o seu valor máximo após 8 a 12 horas, voltando ao normal ao fim de 24 horas. A vantagem da mioglobina sobre outros marcadores cardíacos reside no facto de ser a primeira a aparecer aumentada no sangue. Porém, esta não é específica para a lesão cardíaca. Como consequência, um resultado negativo de

mioglobina exclui o enfarte do miocárdio, mas um resultado positivo necessita de ser confirmado pela troponina [90].

- **precursor N-terminal do peptídeo natriurético tipo pro-B (proBNP)** – é utilizado para diagnosticar e avaliar a gravidade da insuficiência cardíaca. O teste pode ser realizado se o indivíduo apresentar sintomas como inchaço ou edema nas pernas, dificuldade respiratória, falta de ar e fadiga. É possível utilizá-lo em conjunto com outros marcadores cardíacos para detetar stress ou danos cardíacos, e/ou em conjunto com testes de função pulmonar para identificar as causas da falta de ar [91].

4.2.10 - MONITORIZAÇÃO DA ANEMIA

A anemia é causada pela diminuição no número de eritrócitos ou de hemoglobina, resultando numa diminuição do transporte de oxigénio, sendo acompanhada por sintomas de fadiga ou falta de ar. Existem vários tipos de anemias, estas podem ser o resultado de deficiências nutritivas ou doenças dos órgãos hematopoéticos [92].

De forma a detetar possíveis patologias associadas às células vermelhas são efetuadas, através de análises fotométricas e por imunoensaios (pelos equipamentos Cobas 6000; Cobas e 411; Cobas 400 Integra *plus*) as seguintes determinações:

- **Ferritina** - quando um hemograma de rotina apresenta uma hemoglobina e um hematócrito baixo (macrocitose e/ou hipocromia), o resultado pode ser devido a uma anemia por deficiência de ferro, sendo então necessário confirmar a quantidade de ferritina no sangue [93].
- **Folato e Vitamina B12** - são duas vitaminas do Complexo B necessárias para a formação normal das células vermelhas do sangue (eritrócitos) e para reparação de danos tecidulares e síntese do DNA.
 - Uma deficiência de vitamina B12 e/ou folato reflete uma redução crónica dessas substâncias, uma vez que o organismo armazena o suficiente para três a seis anos de vitamina B12, e cerca de três meses de suprimento de folato no fígado, ou seja, as deficiências e os sintomas associados podem levar de meses a anos para se manifestar em adultos [94].

- **Haptoglobina** - é uma proteína produzida pelo fígado cuja função é retirar a hemoglobina livre do plasma e transportá-la até ao fígado para ser destruída [95].
- A diminuição do nível de haptoglobina aliada ao aumento da contagem de reticulócitos, à diminuição da contagem de hemácias, hemoglobina e hematócritos indicam anemia hemolítica;
 - Se a haptoglobina estiver baixa sem sinais de anemia hemolítica, é possível que haja um problema hepático impedindo a síntese de haptoglobina;
 - Se a haptoglobina apresentar níveis normais e a contagem de reticulócitos aumentada, a destruição de hemácias pode estar no fígado e no baço. Nesse caso, não há libertação de hemoglobina livre no plasma e a haptoglobina não é consumida, permanecendo normal.

4.2.11 - MONITORIZAÇÃO DO FERRO

O ferro é um sal mineral fundamental para a formação normal dos eritrócitos, bem como o bom desempenho da função destas células. Faz parte da hemoglobina, a proteína presente nos eritrócitos e responsável pelo transporte de oxigénio. O estado do ferro pode ser avaliado por um ou mais parâmetros que determinam a sua quantidade no sangue, a capacidade que o sangue tem de transportá-lo e a quantidade de ferro de reserva [96].

Na tabela 13 estão relacionados os parâmetros analisados no SPC, através de análises fotométricas (pelos equipamentos Cobas 6000 e Cobas 400 Integra *plus*), que permitem a diferenciação entre diversos tipos de patologias associadas ao ferro.

Tabela 13 - Relação dos parâmetros da monitorização do ferro no sangue com diversas doenças [96].

Doença	Ferro	Capacidade total de transporte de Ferro	Capacidade não-saturada de transporte de Ferro	Saturação da transferrina	Ferritina
Deficiência de ferro	Baixo	Alta	Alta	Baixa	Baixa
Hemocromatose	Alto	Baixa	Baixa	Alta	Alta
Doenças crónicas	Baixo	Baixa	Baixa ou normal	Baixa	Normal ou alta
Anemias hemolíticas	Alto	Normal ou baixa	Baixa ou normal	Alta	Alta
Anemia sideroblásticas	Normal ou alto	Normal ou baixa	Baixa ou normal	Alta	Alta
Envenenamento por ferro	Alto	Normal	Baixa	Alta	Normal

4.2.12 - MONITORIZAÇÃO DE HIDRATOS DE CARBONO

De forma a monitorizar e determinar os níveis de glucose no sangue, assim como os valores da hormona que a metaboliza, são analisados no SPC os seguintes parâmetros por fotometria (pelos equipamentos Cobas 6000 e Cobas 400 Integra *plus*) e por imunoensaio de micropartículas (ARCHITECT *plus* i 2000SR):

- **Glucose** - este açúcar serve para detetar hiperglicemia e hipoglicemia, para ajudar no diagnóstico de diabetes, e para monitorizar os níveis de glucose em diabéticos. Também é utilizado na triagem de pessoas saudáveis e assintomáticas, uma vez que a diabetes é uma doença comum que começa com poucos sintomas [97].
- **Cortisol** - é uma hormona produzida pelas glândulas supra-renais quando estimulada pela hormona adrenocorticotrófica (ACTH). Esta hormona estimula a degradação de proteínas, glucose e lípidos, a manter a pressão arterial e a regular o sistema imunológico. O teste de cortisol é frequentemente efetuado quando um paciente apresenta sintomas sugestivos de síndrome de Cushing (obesidade, perda de massa muscular e fraqueza muscular) ou doença de Addison (fraqueza, fadiga, aumento da pigmentação, entre outros) [98].

- **Hemoglobina Glicada (HbA1c)** – é usada para controlar a diabetes. O objetivo do controlo da diabetes é manter os níveis de glucose no sangue o mais próximo possível do normal. O exame hemoglobina glicada avalia a quantidade média de glicemia no sangue durante os últimos 2 a 3 meses. Pode clarificar sobre a eficácia do tratamento da diabetes e indicar a necessidade de ajustes [99].

4.2.13 - MONITORIZAÇÃO DE LÍPIDOS (PERFIL LIPÍDICO)

O perfil lipídico trata-se de um grupo de análises efetuadas frequentemente em conjunto para avaliar o risco de doença cardíaca coronária. São bons indicadores do risco de enfarte do miocárdio ou de acidente vascular cerebral causados por bloqueio de vasos sanguíneos ou endurecimentos das artérias (arteriosclerose) [100]. As análises que determinam o perfil lipídico são executadas no SPC por fotometria (equipamentos Cobas 6000 e Cobas 400 Integra *plus*). Este perfil é geralmente composto por:

- **Colesterol “*High Density Lipoprotein*” (HDL)** - referido como colesterol “bom”;
- **Colesterol “*Low Density Lipoprotein*” (LDL)** - referido como colesterol “mau”;
- **Colesterol total** - representa a concentração total de colesterol (HDL e LDL);
- **Triglicérideos** - representam a maior parte dos lípidos alimentares.

4.2.14 - METABOLISMO DE PURINAS

O ácido úrico é um produto da degradação das purinas, compostos azotados encontrados em ácidos nucleicos (DNA e RNA). A maior parte do ácido úrico é eliminada na urina. A quantificação de ácido úrico no sangue permite diagnosticar indivíduos com gota, doença provocada pela acumulação de cristais de ácido úrico no líquido sinovial e nos tecidos de articulações. Este teste também é utilizado para monitorizar o nível de ácido úrico em pessoas submetidas a quimioterapia ou radioterapia. A sua determinação na urina serve para avaliar a causa de cálculos renais recorrentes. Ambas as determinações, no sangue e na urina, são analisadas por fotometria (equipamentos Cobas 6000 e Cobas 400 Integra *plus*) [101].

4.2.15 - METABOLISMO MINERAL E ÓSSEO

No SPC de forma a avaliar o metabolismo mineral e ósseo são analisados os seguintes parâmetros:

- **25-hidroxi-vitamina D** - é utilizada para detetar deficiências de vitamina D ou para acompanhar o seu tratamento. O défice desta vitamina ocorre devido à baixa exposição da pele ao sol, ingestão insuficiente das formas vitamina D2 e D3 ou doenças que prejudicam a absorção de lípidos no intestino. É importante monitorizar esta vitamina em indivíduos com sinais e sintomas de descalcificação óssea, como dor disseminada, fraqueza muscular e deformidades ósseas. Esta análise é executada por norma em conjunto com a análise do cálcio e do fósforo, para distinguir diferentes distúrbios do metabolismo do cálcio [102].
- **Cálcio** - o exame de cálcio no sangue é efetuado para analisar várias patologias relacionadas aos ossos, coração, nervos, rins e dentes. Níveis anormais de cálcio estão tipicamente relacionados com doenças na tiroide, no intestino, cancro ou desnutrição. Sintomas como fadiga, fraqueza, perda de apetite, náuseas, vômitos, obstipação, dor abdominal e aumento da sede podem ser um indício de excesso de cálcio [103].
- **Fósforo** - tipicamente a análise da dosagem do fósforo é utilizada para auxiliar no diagnóstico e/ou para monitorizar o tratamento das diversas doenças que causam os desequilíbrios de cálcio e fósforo [104].
- **Magnésio** - como um baixo nível de magnésio pode, com o tempo, causar níveis persistentemente baixos de cálcio e de potássio, o magnésio também é analisado para ajudar a diagnosticar problemas com cálcio, potássio e fósforo [105].

4.2.16 - MONITORIZAÇÃO DE FÁRMACOS

A monitorização de fármacos consiste na quantificação de fármacos específicos a intervalos pré-determinados a fim de manter uma concentração relativamente constante do medicamento na corrente sanguínea. Por norma, os fármacos monitorizados tendem a ter um intervalo terapêutico relativamente estreito, ou seja, a quantidade necessária para o efeito

desejado não é muito distante daquela capaz de causar efeitos colaterais significativos e/ou sinais de intoxicação. Cada indivíduo absorve, metaboliza, utiliza e elimina fármacos a taxas diferentes que variam em função da idade, sexo, estado geral de saúde, constituição genética e interferência com outros fármacos. Assim tem de existir um controlo constante do fármaco na corrente sanguínea [106].

Fármacos monitorizados no laboratório do SPC por fotometria (equipamento Cobas Integra 400 *plus*):

- **Ácido valpróico e Carbamazepina** - usados em casos de epilepsia, para a prevenção de crises convulsivas e algumas vezes como estabilizador do humor;
- **Digoxina** - usada no tratamento insuficiência cardíaca congestiva, angina de peito e arritmias;
- **Gentamicina** - usada no tratamento de infeções por bactérias resistentes a antibióticos menos tóxicos;
- **Fenitoína** - usada no tratamento e prevenção de convulsões, como na epilepsia ou após neurocirurgia;
- **Vancomicina** - usada no tratamento de infeções por bactérias Gram-positivas, resistentes a antibióticos menos tóxicos.

4.2.17 - MONITORIZAÇÃO DA TIROIDE

Um painel da tiroide é um grupo de testes geralmente efetuados para ajudar a avaliar a função da glândula tiroide e diagnosticar distúrbios da tiroide. O painel da tiroide geralmente inclui a análise das seguintes hormonas [107]:

- **Hormona estimulante da tiroide (TSH)** – permite avaliar a função da tiroide ou sintomas de hipotireoidismo e hipertireoidismo, e permite monitorizar a terapia destas patologias;
- **Tiroxina (T4 ou T4 livre)** - permitem avaliar o hipotireoidismo e o hipertireoidismo;
- **Triiodotironina (T3 ou T3 livre)** - permite avaliar o hipertireoidismo.

O TSH é produzido pela hipófise anterior e faz parte do sistema de feedback do corpo para regular os níveis da T4 e T3 no sangue. Quando as concentrações diminuem no sangue, a hipófise é responsável por libertar a TSH. A TSH, por sua vez, estimula a produção e libertação de T4 e T3 pela glândula [107].

A T4 e T3 controlam a taxa metabólica do indivíduo, das seguintes formas [108]:

- Estimulando quase todos os tecidos do corpo a produzir proteínas;
- Aumentando a quantidade de oxigênio que as células usam.

4.3 - ROTINA LABORATORIAL

Antes de efetuar qualquer análise é necessário realizar a manutenção (lavagem das pipetas), as calibrações e os controlos de qualidade nos equipamentos, de acordo com um esquema semanal. Estes procedimentos são por norma efetuados pelo técnico responsável pelo turno da noite ou pelo técnico responsável pela secção no início do dia.

Ao longo do dia é necessário fazer uma verificação dos reagentes, consumíveis, resíduos líquidos e sólidos dos equipamentos. Quando é feita a troca do reagente é necessário fazer a calibração e o controlo do teste.

Depois de efetuados todos estes procedimentos, os equipamentos encontram-se preparados para o processamento das amostras que chegam ao laboratório. Amostras essas, que são processadas dando prioridade a amostras provenientes da urgência e internamento sobre as amostras vindas das consultas e hospital de dia.

CAPÍTULO 5 - IMUNO-HEMATOLOGIA

O estágio na área de Imuno-Hematologia, decorreu de 1 de Abril de 2019 a 15 de Abril de 2019, sobre a coordenação da TSDT, Ana Fernandes. O objeto deste estágio foi a medicina transfusional que se encontra inserida no Banco de Sangue, no qual diariamente são efetuados testes indispensáveis na preparação das transfusões de forma a certificar a segurança imunológica da transfusão.

Neste capítulo são descritos todos os procedimentos importantes para o funcionamento da medicina transfusional, bem como as metodologias laboratoriais e a rotina pré-transfusional. Também se dá relevância ao controlo de qualidade de forma distinta, dado que este serviço não pode ser incluído nos anteriormente descritos.

5.1 - PROCEDIMENTOS DE FUNCIONAMENTO

Em medicina transfusional para garantir a segurança da transfusão, esta requer um conjunto complexo de procedimentos a nível de logística. De forma generalista podemos dividir estes procedimentos em procedimentos de requisição, procedimentos de segurança, controlo de stock e situações de carácter emergente.

5.1.1 - REQUISIÇÃO

De forma a evitar possíveis erros humanos, todos os pedidos de transfusão quando enviados devem estar devidamente acompanhados pelas respetivas requisições e a amostra deve estar identificada com a pulseira transfusional.

A requisição deve conter:

- Nome completo do doente;
- Número do processo / episódio;
- Data de nascimento;
- Identificação do serviço requisitante e do serviço a transfundir;
- Diagnóstico clínico e outras informações;
- Quantidade e tipo de componente pretendido;
- Carácter da transfusão;
- Identificação e assinatura do médico;
- Data, identificação e assinatura de quem efetuou a colheita.

Anexado a este deve estar o Consentimento Informado, devidamente preenchido e assinado pelo doente ou em caso de incapacidade deste, assinado pelo médico responsável ou pelo seu representante legal.

Aquando da entrada do pedido transfusional, é feita a verificação entre a requisição e a amostra através do sistema Gricode (terminal portátil). Posteriormente os pedidos transfusionais são devidamente registados no sistema informático ASIS (Aplicação de Sistema de Informação de Sangue) do Instituto Português do Sangue e Transplantação (IPST), tendo assim acesso a todo o historial clínico e transfusional dos pacientes registados.

A pulseira transfusional (figura 43) encontra-se acompanhada por várias etiquetas, sendo que três etiquetas são para a identificação do paciente, da amostra e da requisição (os dados contidos nessas etiquetas são: o nome, processo/episódio, data de nascimento, data e hora da colheita e a assinatura de quem colhe a amostra) e as restantes são etiquetas de continuação.

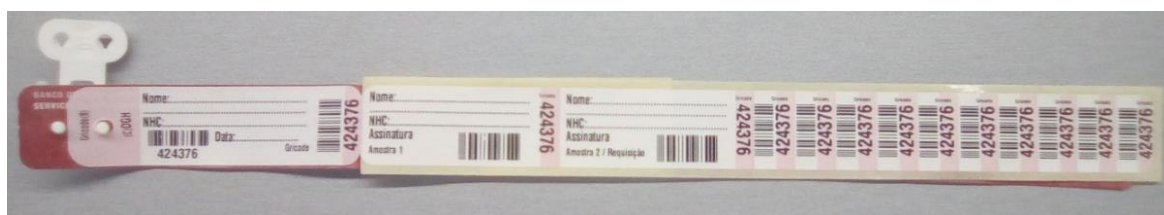


Figura 43 - Pulseira transfusional.

5.1.2 - SEGURANÇA DA CADEIA TRANSFUSIONAL

A segurança de toda a cadeia transfusional tem início com o serviço de enfermagem a efetuar o “*matching*”, isto é a correspondência, entre o pedido de componentes (requisição), a pulseira do paciente e a amostra através do terminal portátil. É enviado ao Banco de Sangue o pedido de componentes sanguíneos e aí será feito novamente o “*matching*” entre o pedido e a amostra, antes de se efetuar o estudo da transfusional.

Após a realização do estudo transfusional é efetuado novamente o “*matching*” entre a requisição do paciente e o componente sanguíneo a administrar, promovendo o controlo e a diminuição de erros no processo transfusional de forma a não colocar em risco a vida do paciente.

Aquando da chegada do componente ao serviço a transfundir, o enfermeiro responsável pelo paciente faz a receção do componente sanguíneo e novamente o “*matching*” entre o componente a administrar e a pulseira do paciente.

Após a administração do componente sanguíneo é feito novamente o “*matching*” entre o componente e a pulseira para declarar o fim da administração do componente.

5.1.3 - CONTROLO DE STOCK

Sempre que o número de unidades dos componentes sanguíneos de um determinado grupo sanguíneo for igual ou inferior ao stock crítico há necessidade de pedir sangue ao Instituto Português de Sangue e Transplantação (IPST). A formalização do pedido de componentes sanguíneos é efetuada por via informática no programa ASIS (já referido anteriormente).

O técnico comunica ao responsável do serviço de instalações e equipamentos a necessidade do meio de transporte para efetuar a deslocação ao IPST, definindo o horário pretendido para esse mesmo fim. É da responsabilidade do técnico que se encontra no banco de sangue o preenchimento da requisição de motorista para o devido transporte das unidades.

Após efetuado o transporte, o motorista entrega ao técnico a mala refrigerada com as unidades requisitadas e a respetiva guia de remessa enviada pelo IPST. Após receção das unidades, é feita a confirmação dessas mesmas com a informação presente na guia de remessa:

- número da colheita;
- tipo de componente (concentrado de eritrócitos e concentrado de plaquetas);
- grupo sanguíneo;
- data de validade.

Quando não se verifica nenhuma discrepância nos dados observados, a guia de remessa é rubricada pelo técnico, sendo também assente na guia a temperatura à chegada das unidades. Por outro lado, sempre que se verifica uma não-conformidade nos dados observados, o mesmo técnico contacta telefonicamente o IPST, devolvendo o componente não-conforme. O técnico procede a entrada de componentes através da aplicação ASIS. Após a criação de etiquetas e a sua colocação nas unidades, estas serão armazenadas em local de armazenamento próprio para o tipo de componente.

5.1.4 - SITUAÇÕES DE CARÁCTER EMERGENTE

Se o carácter da transfusão for emergente, nessa situação é enviada uma unidade de concentrado de eritrócitos O Rh negativo (dador universal) cuja prova de confirmação laboratorial do grupo sanguíneo do saco tenha sido feita previamente. Além disso, deve estar devidamente assinalado na requisição, e assinado pelo médico responsável que este concorda com o envio da unidade sem provas de compatibilidade.

5.2 - MATERIAIS E METODOLOGIAS EM MEDICINA TRANSFUSIONAL

As metodologias utilizadas na rotina do laboratório de Imuno-Hematologia do HSMM, são efetuadas pela técnica em gel e baseadas na análise de reações antigénio-anticorpo, através da aglutinação dos antígenos eritrocitários na presença de anticorpos específicos.

Para a execução das várias provas pré-transfusionais são necessários diferentes reagentes (células, enzimas e diluente) para promover as reações antigénio-anticorpo.

5.2.1 - TÉCNICA EM GEL

Trata-se de uma técnica de fácil leitura, elevada sensibilidade, com resultados eficientes e seguros e sem a necessidade de lavar células. É efetuada por *ID-Cards* da Bio-Rad (figura 44), que são o suporte físico em gel que contêm antígenos, anticorpos, antiglobulina humana entre outros dependendo da determinação a efetuar.

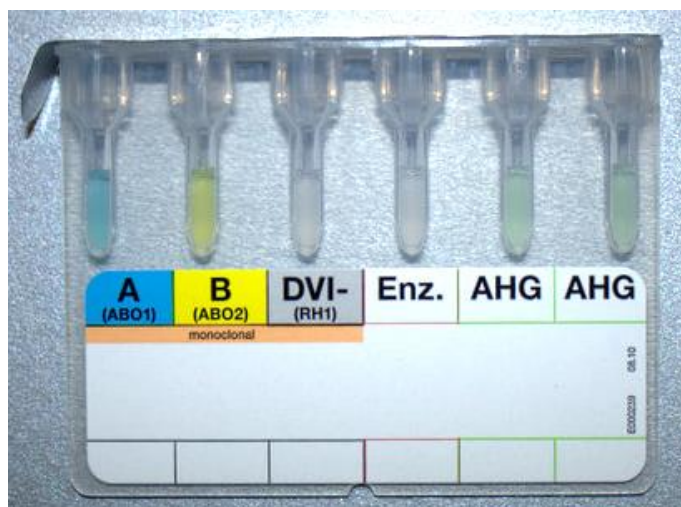


Figura 44 - Exemplo de um *ID-Card* da Bio-Rad para técnica em gel.

Os resultados podem ser interpretados como positivos, negativos ou *mixed-field* (dupla população). Quando os antígenos eritrocitários entram em contacto com os anticorpos correspondentes é despoletada uma reação macroscopicamente visível por via da aglutinação das células no gel. Existem seis tipos/graus de aglutinação:

- Grau 0 – não ocorre aglutinação (eritrócitos no fundo do gel);
- Grau 1 – revelador de aglutinação fraca (eritrócitos dispersos no gel, em que grande parte se encontra no fundo do gel);
- Grau 2 – revelador de aglutinação média (eritrócitos dispersos por todo o gel);
- Grau 3 – revelador de aglutinação forte (eritrócitos dispersos no gel, em que grande parte se encontra na parte superior do gel);
- Grau 4 – revelador de aglutinação muito forte (eritrócitos na parte superior do gel).
- Dupla população (botão duplo de eritrócitos no fundo e na parte superior do gel)

A figura 45 exemplifica os tipos de aglutinação descritos, qualquer grau de aglutinação deve ser considerado como resultado positivo.

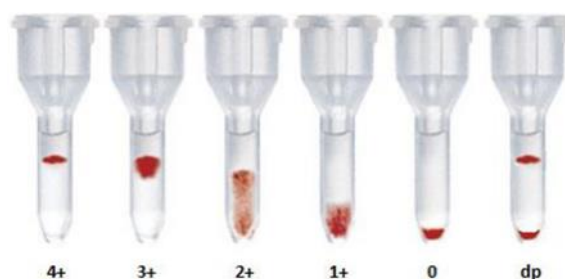


Figura 45 - Tipos de aglutinação possíveis de ocorrer.

5.2.2 - REAGENTES

Em conjunto com os *ID-Cards* é necessário também utilizar vários reagentes de forma a permitir e facilitar as reações antígeno-anticorpo. Estes podem ser:

- **Diluyente 1 (Bromelina)** – a utilização desta enzima em testes serológicos deve-se ao facto de funcionar como um potenciador da aglutinação, pois remove/lisa as proteínas da superfície dos eritrócitos proporcionando um maior contacto entre o antígeno e o anticorpo.

- **Diluyente 2 (“Low Ionic Strength Solution”)** – a utilização desta solução potencia um aumento da taxa de associação do anticorpo à membrana do eritrócito, devido à baixa força iónica da solução.
- **Células teste A₁, A₂, B, O, I e II** – as células teste A₁, A₂, B, O são utilizadas para detetar a presença de anti-A e anti-B na prova reversa, permitindo assim confirmar o grupo sanguíneo (identificado na prova direta). As células I e II fazem parte do grupo O e são vantajosas para a pesquisa de anticorpos frios que pertencem à classe das imunoglobulinas M (IgM).
- **Células teste para identificação de anticorpos irregulares (ID-DiaPanel e ID-Panel-P)** – as células teste ID-DiaPanel e ID-Panel-P pertencem ao grupo O, com o fenótipo conhecido para os vários antigénios sanguíneos: Rhesus (Rh), Kell, Kidd, Duffy, MNS, Lewis, Lutheran, P e Xg (são os mais evidenciados). Estas servem para determinar se o plasma tem anticorpos para estes antigénios.
- **Células teste I, II, III** – são células utilizadas para a pesquisa de anticorpos irregulares em meio Liss/Combs e meio NaCl com adição de enzima (bromelina).

5.3 - ROTINA PRÉ-TRANSFUSIONAL

A transfusão deve ser encarada como uma transplantação, mesmo tratando-se de células (eritrócitos ou plaquetas) ou plasma. As provas pré-transfusionais têm como objetivo obter o máximo de informação sobre o paciente/recetor e estudar a compatibilidade entre ele e o componente transfusional que irá receber, só dessa forma é que é possível garantir uma transfusão segura [109].

Antes de se iniciar as provas pré-transfusionais é feita a integração da amostra e da requisição do paciente/recetor nos sistemas Gricode e ASIS (já referidos anteriormente).

De seguida são efetuadas as provas pré transfusionais na seguinte sequência:

- determinação do grupo sanguíneo ABO/Rh (prova direta e reversa) do recetor;
- determinação do fenótipo Rh/Kell do recetor;
- pesquisa de anticorpos irregulares (PAI) do recetor;
 - Se o PAI for positivo: efetuar a identificação de anticorpos específicos.
- confirmação do grupo sanguíneo do dador e prova de compatibilidade.

Se todas as provas estiverem concordantes com uma transfusão segura, então serão enviados os componentes para o local onde será feita a transfusão.

Estes componentes podem ser:

- **Concentrado de eritrócitos** – obtido por centrifugação e podendo ser armazenado durante 35 a 42 dias (mediante o anticoagulante presente) no frigorífico, com a temperatura controlada entre os 2 a 6 °C. Administrado para tratamento de anemias e hemorragias;
- **Concentrado de plaquetas:** - obtido da separação do sangue de um ou mais doadores. Os sacos ficam em agitação contínua à temperatura ambiente (20-24 °C) durante o seu tempo de validade (5 dias). Normalmente utilizado no tratamento de disfunção plaquetária, hemorragias e trombocitopenia;
- **Plasma fresco congelado** - o plasma fresco é congelado à temperatura de -25 °C e tem 2 anos de validade (durante o período de congelação). Depois de descongelado (se este não for utilizado) é armazenado no frigorífico à temperatura de 2 a 6 °C durante um máximo de 4 horas. É indicado para pacientes com deficiência de fatores de coagulação e defeitos hemostáticos, também pode ser utilizado para reversão rápida do efeito dos anticoagulantes orais (em casos em que a administração de vitamina K seja insuficiente).

Cada uma das provas pré-transfusionais (referidas acima) são descritas por ordem nos capítulos seguintes.

5.3.1 - DETERMINAÇÃO DO GRUPO SANGUÍNEO ABO/RH DO RECETOR

Os antígenos e anticorpos do grupo ABO são de extrema importância na medicina transfusional. A sua incompatibilidade quando associada à hemólise intravascular e rejeição de transplantes de órgãos pode ser fatal, porque os anticorpos IgM são capazes de aglutinar rapidamente os antígenos e ainda ativar os fatores de complemento [109]. A fenotipagem ABO baseia-se na determinação do grupo sanguíneo por prova direta e reversa.

A prova direta consiste na detecção dos antígenos A e B, presentes nas células da amostra (eritrócitos), por aglutinação com antissoros conhecidos anti-A, anti-B e anti-AB a partir de uma amostra de sangue total [109].

Para esta determinação utiliza-se o *ID-Card* “DiaClon ABO/Rh for patients” (figura 46) no qual estão presentes anticorpos monoclonais anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D, anti-CDE e um controlo. Nestes seis microtubos será pipetada uma suspensão das células do recetor, preparada com o diluente 2 (referido anteriormente nos reagentes) [109].

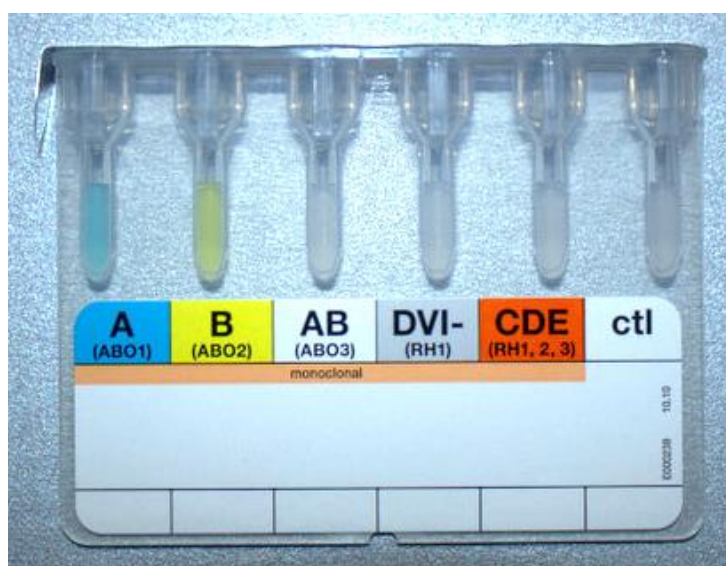


Figura 46 - *ID-Card* “DiaClon ABO/Rh for patients”.

A prova reversa consiste na detecção dos anticorpos anti-A e anti-B presentes no plasma da amostra com a ajuda de células padronizadas A₁, A₂, B e O. As células O são utilizadas para detetar aglutinações provocadas por anticorpos não ABO. Esta prova é de extrema importância, porque, para além da determinação do grupo sanguíneo através dos antígenos presentes na superfície dos eritrócitos, também é importante saber quais são os anticorpos em circulação no sangue do recetor [109].

Para esta prova utiliza-se o *ID-Card* “Reverse Grouping with Antibody Screening” (figura 47), no qual dos seis microtubos totais, três contêm apenas gel e os outros três contêm antiglobulina humana. Nos microtubos com gel são pipetadas as células A₁, A₂ e B acompanhadas com plasma do recetor, nos outros são pipetadas as células O, I e II (vantajosas para a pesquisa de anticorpos) acompanhadas com plasma do recetor [109].



Figura 47 - ID-Card “Reverse Grouping with Antibody Screening”.

Ambos os *ID-Cards* são centrifugados, sendo que o *ID-Card* “Reverse Grouping with Antibody Screening” é previamente incubado à temperatura ambiente.

5.3.2 - DETERMINAÇÃO DO FENÓTIPO RH/KELL DO RECETOR

O objetivo desta prova é determinar a presença de antígenos específicos do sistema Rh (C, c, E, e) na superfície dos eritrócitos. Embora o antígeno K (Kell) não pertença ao sistema Rh, alguns *ID-Cards* permitem testar também a presença deste antígeno. Esta prova é testada através de uma amostra de sangue total [109].

Na preparação de uma transfusão, sempre que possível, devem ser escolhidas unidades que respeitem ambos os fenótipos (Rh e Kell).

Para a realização desta prova é utilizado o *ID-Card* “DiaClon RH-subgroups + K” (figura 48) que contém no gel anticorpos monoclonais anti-C, anti-c, anti-E, anti-e e anti-K e um controlo. É adicionada uma suspensão das células do recetor em diluente 2 nos seis microtubos e o *ID-Card* é centrifugado [109].

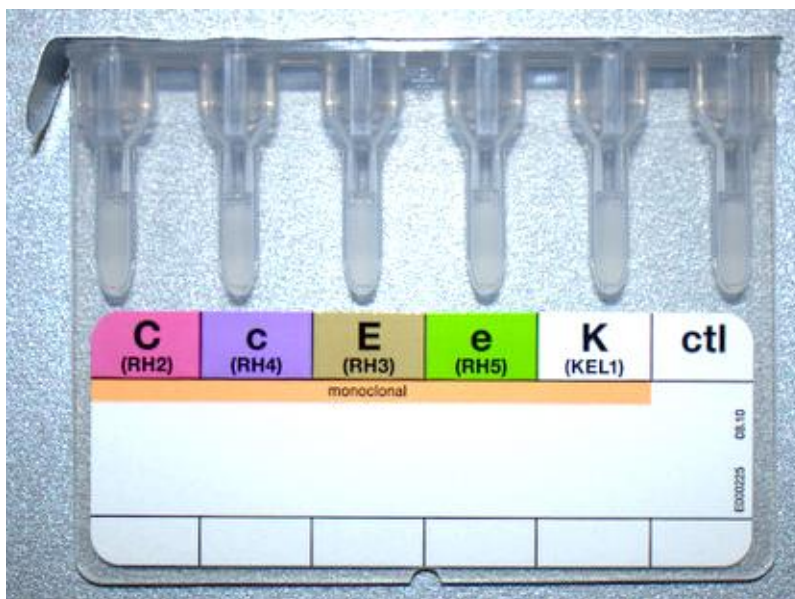


Figura 48 - ID-Card “DiaClon RH-subgroups + K”.

5.3.3 - PESQUISA DE ANTICORPOS IRREGULARES (PAI) DO RECTOR

A pesquisa de anticorpos irregulares tem como objetivo detetar a presença de um o mais anticorpos de ocorrência não esperada, fazendo reagir o soro/plasma de uma amostra com células (I, II e III) de perfil antigénico conhecido. Esta pesquisa é efetuada no *ID-Card* “LISS/Coombs” (figura 49) que possui seis microtubos que contêm antiglobulina humana no gel [109].



Figura 49 - ID-Card “LISS/Coombs”.

Para esta determinação dos 6 microtubos só 3 são utilizados, para onde serão pipetadas as células I, II e III acompanhadas de plasma do recetor. Este *ID-Card* será incubado a 37 °C antes da sua centrifugação.

Se esta prova resultar em positividade, i.e. ocorrer aglutinação das células, então é necessário proceder à identificação dos anticorpos (pesquisa mais alargada de anticorpos irregulares).

5.3.4 - IDENTIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS IRREGULARES

A prova permite identificar anticorpos específicos presentes em amostras onde a Pesquisa de Anticorpos Irregulares resultou em positividade, sendo que nesta prova o plasma do recetor irá ser testado com 11 células em 3 meios diferentes. Estas células possuem vários grupos de antígenios sanguíneos cujo fenótipo é conhecido, podendo assim comparar os resultados com uma tabela padronizada e determinar os anticorpos presentes em circulação [109].

Para a prova são necessários dois *ID-Cards* “LISS/Coombs” (figura 49), e dois *ID-Cards* “NaCl, Enzyme Test and cold Agglutinins” (figura 50) com bromelina adicionada, para onde serão pipetadas as 11 células do ID-Panel (uma em cada microtubo). Ao mesmo tempo em outros dois *ID-Cards* “NaCl, Enzyme Test and cold Agglutinins” são adicionadas as 11 células do ID-Panel-P (uma em cada microtubo), células estas que contêm a papaína incorporada.



Figura 50 - ID-Card “NaCl, Enzyme Test and cold Agglutinins”.

[illegible]

5.3.5 - CONFIRMAÇÃO DO GRUPO SANGUÍNEO DO DADOR E PROVA DE COMPATIBILIDADE

A prova de compatibilidade consiste em pôr em contacto o plasma/soro do paciente (recetor) com as células do possível ou possíveis dadores, de forma a detetar se o recetor terá ou não anticorpos em circulação capazes de destruir as células do dador [109].

88

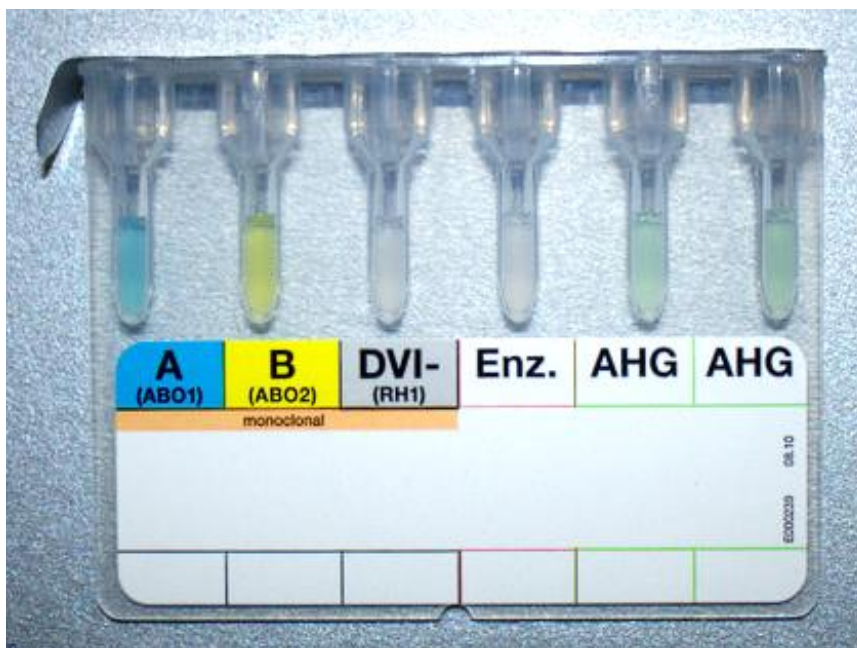


Figura 52 - ID-Card “DiaClon Complete Crossmatch”.

A determinação do grupo ABO/Rh do dador é efetuada nos três primeiros microtubos, onde é pipetada uma suspensão das células do dador (em diluente 2). A prova de compatibilidade é efetuada no quinto microtubo que contém meio AGH, onde é pipetada a suspensão das células do dador e plasma do recetor, e o *ID-Card* é incubado a 37 °C.

5.4 - CONTROLO DE QUALIDADE

Para garantir um elevado nível de qualidade na área da Imuno-Hematologia e até poder melhorá-la, é necessário realizar controlos de qualidade, quer internos quer externos, de forma a assegurar a manutenção da exatidão e da precisão dos testes, avaliando assim os reagentes, os materiais, os aparelhos, os métodos e os técnicos que os realizam nesta área.

5.4.1 - CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

O controlo de qualidade interno é efetuado diariamente no início do serviço. Este é efetuado por um kit (IH-QC Modular System da BioRad) com oito tubos contendo 6 mL de uma suspensão de eritrócitos humanos, sendo que cada tubo apresenta características diferentes, estando estas descritas na Bula do kit. São executados todos os testes pré-transfusionais com uma das amostras do kit (a amostra varia consoante o dia). Depois de obtidos os resultados,

estes são comparados com os resultados presentes na Bula do kit (figura 53), de forma a perceber se os métodos utilizados estão a funcionar devidamente.

Quadro 2	ABO	RH	K	FY	Anticorpos		TAD
IH-QC1 	A ₁ [ABO:1,-2,3,4]	ddccce (rr) C*- [RH:-1,-2,-3,4,5,-8]	K+ [KEL:1]	N/A	Anti-B [Anti-ABO2]	Anti-D ≤ 0,05 UI/ml [Anti-RH1]	Neg
IH-QC2 	B [ABO:1,2,3]	DCcEe (R ₁ R ₂) C*- [RH:1,2,3,4,5,-8]	K- [KEL:-1]	Fy(a-) [FY:-1]	Anti-A [Anti-ABO1]	Anti-Fy ^a [Anti-FY1]	Neg
IH-QC3 	AB [ABO:1,2,3]	DCcEe (R ₁ R ₂) C*- [RH:1,2,-3,-4,5,-8]	K- [KEL:-1]	N/A	Anti-c [Anti-RH4]		Neg
IH-QC4 	O [ABO:-1,-2,-3]	DccEE (R ₁ R ₂) C*- [RH:1,2,3,4,5,-8]	K- [KEL:-1]	N/A	Anti-A & Anti-B [Anti-ABO1 e Anti-ABO2]	Anti-K [Anti-KEL1]	Neg
IH-QC5 	A ₂ [ABO:1,-2,3,-4]	DCcEe (R ₁ r) C*- [RH:1,-2,3,4,5,-8]	K- [KEL:-1]	N/A	Anti-B [Anti-ABO2]		Neg
IH-QC6 	N/A	D fraco [RH:W1]	N/A	N/A	N/A		Neg
IH-QC7 	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A		Pos [IgG]
IH-QC8 	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A		Pos [C3b (c/d)]

Figura 53 - Tabela do kit IH-QC Modular System da BioRad (fonte: IH-QC Modular System; Bula Bio-Rad).

5.4.2 - CONTROLO DE QUALIDADE EXTERNO

O controlo de qualidade externo é um controlo inter-laboratorial avaliado trimestralmente pela Bio-Rad. O kit do controlo engloba todo o estudo pré-transfusional com a exceção das provas de compatibilidade, através de amostras previamente analisadas pela entidade externa (Bio-Rad).

Os resultados obtidos são enviados para essa mesma entidade, com a finalidade de avaliar o desempenho.

CONCLUSÕES

Podemos concluir que os objetivos propostos foram alcançados, dado que o estágio serviu para compreender todo o funcionamento das áreas da Microbiologia, Hematologia/Coagulação, Imunoquímica e Imuno-Hematologia do Serviço de Patologia do HSMM.

Como discutido e descrito ao longo do relatório pode-se afirmar que os conceitos relacionados à forma de execução, análise e observação de todo o trabalho laboratorial desenvolvido no dia-a-dia de um laboratório hospitalar de análises clínicas foram assimilados, bem como os conceitos teóricos associados.

A experiência da rotina laboratorial diária e o contacto em ambiente hospitalar com variados casos clínicos de variadas especificidades permitiu desenvolver um espírito crítico perante os resultados das análises clínicas e desenvolver um maior conhecimento sobre o diagnóstico laboratorial de diversas patologias.

Também é importante referir que sem o apoio e a comunicação com os técnicos que compõem o serviço de patologia clínica, este trabalho nunca poderia ser efetuado. Muito do conhecimento exposto neste relatório advém da experiência e dedicação destas pessoas.

Por outro lado, pode perceber-se pelo exposto neste relatório que a segurança e garantia de qualidade no processo laboratorial e logístico são de extrema importância para o bom funcionamento de um laboratório hospitalar de forma assegurar uma melhor saúde a todos os intervenientes, com o máximo de rapidez e eficácia.

Como últimas considerações, declaro que esta experiência foi enriquecedora em vários aspetos, mas que ainda há muito mais a explorar nesta complexa área, por forma a elevar este conhecimento a outro patamar. E espero que este relatório sirva como referência para que outros experienciem e se dediquem a esta área tão importante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Ordem dos Farmacêuticos Associação Portuguesa de Analistas Clínicos (2016), Normas para o Laboratório Clínico, Sistema de Gestão da Qualidade para os Laboratórios Clínicos, 3ª Edição.
- [2] Pina M. B. (1996), Despacho n.º 242/96, 2ª série do Diário da República n.º 187 de 13 de Agosto, pp 11380-11381. Ministério da Saúde.
- [3] <https://www.dgs.pt/servicos-on-line1/sinave-sistema-nacional-de-vigilancia-epidemiologica.aspx> [Acedido em: 28-05-2019].
- [4] Rodrigues, M. R., Lebre, A. I., Alves, A., et al. (2018), Infecções e Resistências aos Antimicrobianos: Relatório Anual do Programa Prioritário 2018, Direção Geral da Saúde.
- [5] Junqueira-Neto, S., Batista, I. A., Costa, J. L., Melo, S. A. (2019). Liquid Biopsy beyond Circulating Tumor Cells and Cell-Free DNA. *Acta Cytologica*, doi: 10.1159/000493969.
- [6] Fonseca, A. B., Sebastião, C., Martins, F. J., et al. (2004), Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia, Ministério da Saúde - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.
- [7] Brain-Heart Infusion Broth (BHI-T) (Culture of fastidious bacteria) [Bula], BioMérieux, 2010.
- [8] Rappaport broth (RAPPAPORT-T) (Enrichment broth for Salmonella) [Bula], BioMérieux, 2012.
- [9] Lowenstein-Jensen medium (LJ-T) (Culture of Mycobacterium tuberculosis and other mycobacteria) [Bula], BioMérieux, 2006.
- [10] Schaedler Broth + vit. K3 (SCHAEDK3 B-T) (Culture of anaerobic bacteria) [Bula], BioMérieux, 2013.
- [11] Esculin Agar (ESCU-T) (Detection of the hydrolysis of esculin) [Bula], BioMérieux, 2005.
- [12] Sheep Blood Agar (Isolation of bacteria. Determination of haemolysis) [Bula], BioMérieux.

- [13] Chocolate agar + PolyViteX VCAT3 (Selective isolation of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*) [Bula], BioMérieux, 2016.
- [14] CLED Agar (Isolation of microorganisms in urine) [Bula], BioMérieux.
- [15] MacConkey Agar without Salt (Isolation and differentiation of Gram (-) enteric bacilli) [Bula], BioMérieux.
- [16] SS agar (SS) [Bula], BioMérieux, 2016.
- [17] XLD Agar (Selective isolation of *Salmonella* and *Shigella*) [Bula], BioMérieux.
- [18] Sabouraud Dextrose Agar [Bula], BioMérieux.
- [19] Campylosel Agar (CAM) [Bula], BioMérieux, 2016.
- [20] Yersinia Selective Agar (Selective isolation of *Yersinia*) [Bula], BioMérieux.
- [21] chromIDTM MRSA Agar (Chromogenic medium for the screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)) [Bula], BioMérieux.
- [22] Color Gram 2 (COLOR GRAM 2 - F) Coloração dos microrganismos [Bula], BioMérieux, 2015.
- [23] KINYOUN (Acid fast staining kit) [Bula], Salubris Inc. 2018.
- [24] PastorexTM Staph-plus (Latex agglutination test for the identification of *Staphylococcus aureus*) [Bula], Bio-Rad, 2015.
- [25] Alere™ BinaxNOW™ *Legionella* Urinary Antigen Card [Bula], Alere™, 2018.
- [26] Uni-Gold™ *S.pneumoniae* [Bula], Trinity Biotech, 2018.
- [27] bioNexia™ FOBplus [Bula], BioMérieux, 2014.
- [28] Rota-Strip [Bula], Coris BioConcept, 2017.
- [29] Adeno Respi-Strip [Bula], Coris BioConcept, 2013.
- [30] RSV Respi-Strip [Bula], Coris BioConcept, 2017.
- [31] BACT ALERT® 3D – Manual do Utilizador, BioMérieux, 2015. [Online] Disponível em:
https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/User_Manual/673010

01-67302000/User_Manual_-_514818-1PT1_-_2015-12_-_pt_-_BacTALERT_3D_-_B.50.pdf [Acedido em: 30-06-2019].

[32] <https://www.biomerieux.pt/produto/vitek-2-ast-cards> [Acedido em: 28-05-2019].

[33] Greenlee, J. E. (2017), Visão geral da meningite, MSD Manual Professional Edition,. [Online] Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-pt/profissional/distúrbios-neurológicos/meningite/visão-geral-da-meningite> [Acedido em: 30-06-2019].

[34] BD Directigen™ Meningitis Combo Test [Bula], Becton Dickinson &Co, 2016.

[35] Fried, M. P. (2017), Sinusite, MSD Manual Professional Edition. [Online] Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-pt/profissional/distúrbios-do-ouvido,-nariz-e-garganta/distúrbios-de-nariz-e-seios-paranasais/sinusite> [Acedido em: 30-06-2019].

[36] Kuter, D. J. (2017), Exames laboratoriais relacionados a distúrbios sanguíneos, MSD Manual Consumer Edition. [Online] Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-pt/casa/distúrbios-do-sangue/sintomas-e-diagnóstico-dos-distúrbios-do-sangue/exames-laboratoriais-relacionados-a-distúrbios-sanguíneos> [Acedido em: 30-06-2019].

[37] Gualandro, S. F. M. (2013), Análise do Exame Hematológico. Alterações dos Eritrócitos, Tratado de Hematologia, 84:833-840.

[38] Contagem de reticulócitos, Labtestsonline.org (2018). [Online] Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/contagem-de-reticulocitos> [Acedido em: 30-06-2019].

[39] Theml, H., Heinz, D., Torsten, H. (2004), Physiology and Pathophysiology of Blood Cells: Methods and Test Procedures, Color atlas of hematology: practical microscopic and clinical diagnosis, 1:1-27, 2ª Edição.

[40] Territo, M. (2018), Considerações gerais sobre distúrbios dos glóbulos brancos, MSD Manual Consumer Edition. [Online] Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-pt/casa/distúrbios-do-sangue/distúrbios-dos-glóbulos-brancos/considerações-gerais-sobre-distúrbios-dos-glóbulos-brancos> [Acedido em: 30-06-2019].

[41] Territo, M. (2018), Doenças dos monócitos, MSD Manual Consumer Edition. [Online] Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-pt/casa/distúrbios-do-sangue/distúrbios-dos-glóbulos-brancos/doenças-dos-monócitos> [Acedido em: 30-06-2019].

- [42] Territo, M. (2018), Doenças eosinofílicas, MSD Manual Consumer Edition. [Online] Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-pt/casa/distúrbios-do-sangue/distúrbios-dos-glóbulos-brancos/doenças-eosinofílicas> [Acedido em: 30-06-2019].
- [43] Territo, M. (2018), Doenças basofílicas, MSD Manual Consumer Edition. [Online] Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-pt/casa/distúrbios-do-sangue/distúrbios-dos-glóbulos-brancos/doenças-basofílicas> [Acedido em: 30-06-2019].
- [44] Wendland, A. E., Farias, M. G., Manfroí, W. C. (2009), Volume plaquetário médio e doença cardiovascular, *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 45(5):371-378.
- [45] Costa, J. S. (2011), Estudo da velocidade de sedimentação na população geriátrica saudável, Tese de Mestrado, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.
- [46] Moake, J. L. (2017), Como o sangue coagula, MSD Manual Consumer Edition. [Online] Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-pt/casa/distúrbios-do-sangue/o-processo-de-coagulação-sanguínea/como-o-sangue-coagula> [Acedido em: 30-06-2019].
- [47] Hemostasis Reagents Portfolio – Siemens Healthcare, Siemens Healthcare GmbH (2019). [Online] Disponível em: https://static.healthcare.siemens.com/siemens_hwem-hwem_ssxa_websites-context-root/wcm/idc/groups/public/@global/@lab/@corelab/documents/download/mda4/odg5/~edisp/ld_ous_hemostasis_reagent_portfolio_brochure_03_2019-06176738.pdf [Acedido em: 30-06-2019]
- [48] Moake, J. L. (2016), Coagulação intravascular disseminada (CID) (Coagulopatia de consumo; Síndrome da desfibrinação), MSD Manual Professional Edition. [Online] Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-pt/profissional/hematologia-e-oncologia/distúrbios-de-coagulação/coagulação-intravascular-disseminada-cid> [Acedido em: 30-06-2019].
- [49] Douketis, J. D. (2018), Trombose venosa profunda (TVP), MSD Manual Professional Edition. [Online] Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-pt/profissional/doenças-cardiovasculares/doenças-venosas-periféricas/trombose-venosa-profunda-tvp> [Acedido em: 30-06-2019].

- [50] Tapson, V. F. (2015), Embolia pulmonar (EP), MSD Manual Professional Edition. [Online] Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-pt/profissional/distúrbios-pulmonares/embolia-pulmonar-ep/embolia-pulmonar-ep> [Acedido em: 30-06-2019].
- [51] <https://www.sebia.com/en-EN/produits/minicap> [Acedido em: 30-06-2019].
- [52] URISYS 2400 - Operator's Manual Version 1.0, Roche, 2001. [Online] Disponível em: <https://www.yeec.com/uploadimages1/forum/roche/urisy2400-gb.pdf> [Acedido em: 30-06-2019].
- [53] Products and Solutions 2016 - Roche Diagnostics, Roche, 2016.
- [54] ARCHITECT® System Operations Manual (i 2000, i2000SR, c 8000, ci 8200, c 16000, ci 16200), Abbott, 2007. [Online] Disponível em: https://www.yeec.com/uploadimages1/forum/ABBOTT/ABBOTT_ARCHITECT_C16000c8000i2000i2000srci8200ci16200操作手册全版.pdf [Acedido em: 30-06-2019].
- [55] Cots, P., Pena, J. M., Botey, J., et al. (1998), Determination of total and specific IgE using UNICAP 100: comparative study with the CAP system. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 1998 Sep-Oct;26(5):223-7.
- [56] SureStep™ MultiDrug [Bula], Innovacon, Inc., 2016.
- [57] IMMUTREP® TPHA [Bula], OMEGA DIAGNOSTICS Ltd., 2012.
- [58] SD Malaria Ag P.f/Pan [Bula], Alere™, 2015.
- [59] Teste de HCG na urina num só passo [Bula], Guangzhou Wondfo Biotech Co., Ltd., 2016.
- [60] Clearview MI II [Bula], Innovacon, Inc., 2017.
- [61] VISITECT® LEPTOSPIROSIS [Bula], OMEGA DIAGNOSTICS Ltd., 2013.
- [62] Figler, B. D. (2017), Urinálise e cultura de urina, MSD Manual Consumer Edition. [Online] Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-pt/casa/distúrbios-renais-e-urinários/diagnóstico-dos-distúrbios-renais-e-urinários/urinálise-e-cultura-de-urina> [Acedido em: 30-06-2019].

- [63] Pinheiro P., Exame de Urina - Leucócitos, Nitritos, Hemoglobina, MD.Saúde, 2019.
[Online] Disponível em: <https://www.mdsaude.com/exames-complementares/exame-de-urina>
[Acedido em: 30-06-2019].
- [64] Kasvi - notícias, Sedimentoscopia: Análise Microscópica de Sedimento de Urina, (2018).
[Online] Disponível em: <https://kasvi.com.br/sedimentoscopia-analise-urina/> [Acedido em: 30-06-2019].
- [65] <https://www.roche.pt/hepatites/marcadores.cfm> [Acedido em: 30-06-2019].
- [66] HIV Ag/Ab Combo (Architect System) [Bula], Abbott Laboratories, 2009.
- [67] CA 125 II (Architect System) [Bula], Abbott Laboratories, 2009.
- [68] CA 15-3 (Architect System) [Bula], Abbott Laboratories, 2009.
- [69] CA 19-9XR (Architect System) [Bula], Abbott Laboratories, 2009.
- [70] CEA (Architect System) [Bula], Abbott Laboratories, 2009.
- [71] Marcadores tumorais, Labtestsonline.org, (2017). [Online] Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/marcadores-tumorais> [Acedido em: 30-06-2019].
- [72] Beta-2 microglobulina, Labtestsonline.org, (2019). [Online] Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/beta-2-microglobulina> [Acedido em: 30-06-2019].
- [73] Rubella IgG (Architect System) [Bula], Abbott Laboratories, 2009.
- [74] Rubella IgM (Architect System) [Bula], Abbott Laboratories, 2007.
- [75] Toxo IgM (Architect System) [Bula], Abbott Laboratories, 2008.
- [76] Toxo IgG (Architect System) [Bula], Abbott Laboratories, 2009.
- [77] CMV IgM (Architect System) [Bula], Abbott Laboratories, 2007.
- [78] CMV IgG (Architect System) [Bula], Abbott Laboratories, 2008.
- [79] Albumina, Labtestsonline.org, (2017). [Online] Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/albumina> [Acedido em: 30-06-2019].
- [80] Orfanidis, N. T. (2017), Exames laboratoriais para fígado e da vesícula biliar, MSD Manual Professional Edition. [Online] Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt->

pt/profissional/distúrbios-hepáticos-e-biliares/exames-para-distúrbios-hepáticos-e-biliares/exames-laboratoriais-para-fígado-e-da-vesícula-biliar [Acedido em: 30-06-2019].

[81] ALT, Labtestsonline.org, (2017). [Online] Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/alt> [Acedido em: 30-06-2019].

[82] AST, Labtestsonline.org, (2017). [Online] Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/ast> [Acedido em: 30-06-2019].

[83] Amônia, Labtestsonline.org, (2017). [Online] Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/amonia> [Acedido em: 30-06-2019].

[84] Bansal, R. (2017), Pancreatite aguda, MSD Manual Professional Edition. [Online] Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-pt/profissional/distúrbios-gastrointestinais/pancreatite/pancreatite-aguda> [Acedido em: 30-06-2019].

[85] Shah, A. P., (2016) Avaliação do paciente renal, MSD Manual Professional Edition. [Online] Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-pt/profissional/distúrbios-geniturinários/abordagem-ao-paciente-geniturinário/avaliação-do-paciente-renal> [Acedido em: 30-06-2019].

[86] LDH, Labtestsonline.org, (2017). [Online] Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/ldh> [Acedido em: 30-06-2019].

[87] Creatina quinase, Labtestsonline.org, (2019). [Online] Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/creatina-quinase> [Acedido em: 30-06-2019].

[88] CK-MB, Labtestsonline.org, (2017). [Online] Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/ck-mb> [Acedido em: 30-06-2019].

[89] Troponina, Labtestsonline.org, (2019). [Online] Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/troponina> [Acedido em: 30-06-2019].

[90] Mioglobina, Labtestsonline.org, (2017). [Online] Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/mioglobina> [Acedido em: 30-06-2019].

[91] BNP e NT-próBNP, Labtestsonline.org, (2019). [Online] Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/bnp-e-nt-probnp> [Acedido em: 30-06-2019].

- [92] Braunstein, E. M. (2017), Avaliação da anemia, MSD Manual Professional Edition. [Online] Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-pt/profissional/hematologia-e-oncologia/abordagem-ao-paciente-com-anemia/avaliação-da-anemia> [Acedido em: 30-06-2019].
- [93] Ferritina, Labtestsonline.org, (2019). [Online] Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/ferritina> [Acedido em: 30-06-2019].
- [94] Deficiência de Vitamina B12 e Folato, Labtestsonline.org, (2017). [Online] Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/conditions/deficiencia-de-vitamina-b12-e-folato> [Acedido em: 30-06-2019].
- [95] Haptoglobina, Labtestsonline.org, (2019). [Online] Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/haptoglobina> [Acedido em: 30-06-2019].
- [96] Exames do ferro, Labtestsonline.org, (2018). [Online] Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/exames-do-ferro> [Acedido em: 30-06-2019].
- [97] Glicose, Labtestsonline.org, (2019). [Online] Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/glicose> [Acedido em: 30-06-2019].
- [98] Cortisol, Labtestsonline.org, (2017). [Online] Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/cortisol> [Acedido em: 30-06-2019].
- [99] Hemoglobina glicada e glicemia média estimada, Labtestsonline.org, (2019). [Online] Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/hemoglobina-glicada-e-glicemia-media-estimada> [Acedido em: 30-06-2019].
- [100] Perfil lipídico, Labtestsonline.org, (2017). [Online] Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/perfil-lipidico> [Acedido em: 30-06-2019].
- [101] Ácido Úrico, Labtestsonline.org, (2017). [Online] Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/acido-urico> [Acedido em: 30-06-2019].
- [102] Vitamina D, Labtestsonline.org, (2017). [Online] Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/vitamina-d> [Acedido em: 30-06-2019].
- [103] Cálcio, Labtestsonline.org, (2019). [Online] Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/calcio> [Acedido em: 30-06-2019].

- [104] Fósforo, Labtestsonline.org, (2017). [Online] Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/fosforo> [Acedido em: 30-06-2019].
- [105] Magnesium, Labtestsonline.org, (2017). [Online] Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/magnesium> [Acedido em: 30-06-2019].
- [106] Monitoramento de drogas terapêuticas, Labtestsonline.org, (2017). [Online] Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/tests/monitoramento-de-drogas-terapeuticas> [Acedido em: 30-06-2019].
- [107] Doenças da tireoide, Labtestsonline.org, (2017). [Online] Disponível em: <https://labtestsonline.org.br/conditions/doencas-da-tireoide> [Acedido em: 30-06-2019].
- [108] Hershman, J. M. (2018), Overview of the Thyroid Gland, MSD Manual Consumer Edition. [Online] Disponível em: <https://www.merckmanuals.com/home/hormonal-and-metabolic-disorders/thyroid-gland-disorders/overview-of-the-thyroid-gland?qt=thyroxine&alt=sh> [Acedido em: 30-06-2019].
- [109] Teixeira, S. J. P. (2016), Relatório de Estágio em Imunohematologia no Instituto Português do Sangue e Transplantação, Escola Superior de Saúde do Porto. [Online] Disponível em: <https://www.studocu.com/pt/document/universidade-do-porto/imunohematologia/outro/relatorio-de-estagio-imunohematologia-no-ipst/3064276/view> [Acedido em: 30-06-2019]