

Francisca Almeida Martins da Silva

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Doutor Frederico Fernando Monteiro Marques Valido e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

“Far better is it to dare mighty things, to win glorious triumphs, even though checkered by failure... than to rank with those poor spirits who neither enjoy nor suffer much, because they live in a gray twilight that knows not victory nor defeat.”

Theodore Roosevelt

Agradecimentos

Primeiramente agradeço ao Dr. Frederico Valido, Diretor do Serviço de Patologia Clínica do IPO de Coimbra, por me ter aceitado para a realização deste estágio no seu serviço e por toda a disponibilidade, conhecimento e orientação que demonstrou ao longo destes sete meses.

Agradeço à Professora Dr^a. Leonor Almeida, Coordenadora do Mestrado de Análises Clínicas, por todo o apoio, força, motivação, orientação e confiança que demonstrou ao longo destes dois anos de mestrado.

À Professora Dr^a Teresa Dinis pelo apoio, ajuda e colaboração na melhoria do relatório.

Aos meus pais agradeço a educação, os ideais e os valores que me transmitiram e que fazem de mim a pessoa que sou. Além disso, não posso deixar de referir o apoio e a confiança que depositaram em mim nestes cinco anos longe de casa. Apesar dos muitos fins de semana em que não estive presente, sabia e sentia que mesmo longe podia contar com eles. Acreditaram em mim desde o início.

Ao meu irmão agradeço a paciência e peço-lhe desculpas pelo tempo que não estive disponível para o ajudar.

Aos meus amigos agradeço-lhes pela força e motivação que me deram nos momentos menos bons, pela paciência que tiveram quando os dias se tornaram exaustivos e o meu feitio já não era o melhor.

Às pessoas com quem tive a oportunidade de trabalhar no Serviço de Patologia Clínica do IPO de Coimbra agradeço-lhes todo o conhecimento que me transmitiram, toda a paciência que tiveram comigo para eu poder aprender. Foram ótimos professores. O meu sincero Obrigada.

Tornaram esta experiência ainda mais especial.

Índice

Lista de Abreviaturas	vi
Resumo.....	x
Abstract.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. CARACTERIZAÇÃO DO SERVIÇO DE PATOLOGIA CLÍNICA	3
2.1.Sector de Microbiologia	5
• Urina.....	5
• Hemoculturas	6
• Fezes	7
• Expectoração e outras secreções respiratórias	10
• Exsudados (genitais, auriculares,feridas)	11
• Outros líquidos biológicos	13
• Ponta de cateter	13
• Biópsia para pesquisa de <i>Helicobacter pylori</i>	13
➤ EXAME MICROBIOLÓGICO	14
➤ EXAME MICOLÓGICO	15
➤ ATMOSFERA SELETIVA.....	16
➤ PROVAS DE IDENTIFICAÇÃO.....	16
➤ PROVA DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	18
➤ CONTROLO DE QUALIDADE.....	21
2.2.Sector de Hematologia.....	22
➤ HEMOGRAMA.....	22
➤ ESFREGAÇO DE SANGUE PERIFÉRICO.....	27
➤ VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO	29
➤ MEDULOGRAMA.....	29
➤ HEMOSTASE	30
• Determinação do Tempo de Protrombina	31
• Determinação do Tempo de Trombina	32

•	Determinação do aPTT	32
•	Determinação do Fator VIII	33
•	Determinação da Proteína C	33
•	Determinação da Proteína S livre	33
•	Deteção do Anticoagulante Lúpico	34
•	Quantificação do Fibrinogénio	34
•	Quantificação dos D-Dimeros.....	35
➤	CITOMETRIA DE FLUXO	35
➤	ESTUDO DO GENE BCR-ABL	37
➤	TESTE DE GRAVIDEZ	37
➤	CONTROLO QUÍMICO DE QUALIDADE.....	37
2.3.	Sectores de Imunologia, Serologia e Hormonologia.....	40
➤	TECNICAS MANUAIS	42
2.4.	Sector de Bioquímica.....	44
➤	DETERMINAÇÃO DO CÁLCIO IONIZADO	44
➤	GASOMETRIA.....	44
➤	TÉCNICAS MANUAIS	45
➤	TESTE RPR	46
➤	PESQUISA de <i>Brucella spp</i>	47
3.	CONCLUSÃO.....	48
4.	BILBIOGRAFIA.....	49

Lista de Abreviaturas

- β -HCG - Gonadotrofina coriônica humana, do inglês *Human chorionic gonadotropin*
- AF - α - Fetoproteína
- AL - Anticoagulante Lúpico
- ALT- Alanina aminotransferase
- ANA's - Anticorpos anti-nucleares, do inglês *Antinuclear antibodies*
- ANA – Anaeróbios
- ANCA's - Anticorpo anti-citoplasma de neutrófilos, do inglês *Antineutrophil cytoplasmic antibody*
- aPTT - Tempo de Tromboplastina Parcial ativada, do inglês *activated partial thromboplastin time*
- AST- Aspartato aminotransferase
- ATB - Antibiograma
- ATCC – *American Type Culture Collection*
- ATG - Anticorpos anti- tiroglobulina
- BAAR– Bacilos ácido - álcool resistentes
- BAP - Fosfatase alcalina fração óssea, do inglês *Bone alkaline phosphatase*
- CA 125 - Antígeno Carbohidrato 125, do inglês *carbohydrate antigen 125*
- CA 15.3 - Antígeno Carbohidrato 15.3, do inglês *carbohydrate antigen 15.3*
- CA 19.9 - Antígeno Carbohidrato 19.9, do inglês *carbohydrate antigen 19.9*
- CA 72.4 - Antígeno Carbohidrato 72.4, do inglês *carbohydrate antigen 72.4*
- CAL - Calcitonina
- CAMP- *Campylosel*
- CEA - Antígeno Carcinoembrionário, do inglês *Carcinoembryonic antigen*
- CgA - Cromogranina A
- CK-MB massa–Creatinacinase- MB massa
- CLED - Cistina, lactose, déficit em electrólitos
- CHCM - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
- CMI - Concentração Mínima Inibitória
- CNA – Colistina e Ácido nalidíxico
- COS - *Columbia + sheep blood*

- DHEA-SO₄ - Dehidroepiandrosterona Sulfato
- DIC - Coagulação Intravascular Disseminada, do inglês *Disseminated intravascular coagulation*
- dRVVT – *dilute Russel's viper venom time*
- EBV – *Epstein-Barr virus*
- EDTA - Ácido Etilenodiaminotetraacético
- ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- EPN - Eritropoítina
- ESBL - β -lactamases de espectro alargado, do inglês *Extended Spectrum β -lactamases*
- EUCAST -*The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
- FT3 –*Free thyroxine 3*
- FT4 –*Free thyroxina 4*
- FPSA - Antígeno Específico da Próstata livre, do inglês *Free prostate specific antigen*
- FSH - Hormona Folículo Estimulante, do inglês *Follicle-stimulating hormone*
- GAS - Gastrina
- GDH - Glutamato desidrogenase
- GGT- γ -glutaminotransferase
- GH - Hormona de crescimento, do inglês *Growth hormone*
- Hb- Hemoglobina
- HEK- Hektoen
- HCM- Hemoglobina Corpuscular Média
- HT- Hematócrito
- ID - Identificação
- IL6 - Interleucina 6
- IPO - Instituto Português de Oncologia
- INR – *International Normalized Ratio*
- INSA - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
- LCR - Líquido Cefaloraquídeo
- LH - Hormona Luteinizante, do inglês *Luteinizing hormone*
- MH2 -Mueller-Hinton 2
- MRSA –*Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, do inglês *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

- MPO- Mieloperoxidase
- MTP- Metanefrinasplasmáticas
- NAD- Dinucleótido de nicotinamida e adenina, em inglês *Nicotinamide adenine dinucleotide*
- NMP- Normetanefrinas plasmáticas
- NT Pró-BNP - N-terminal do péptido natriurético cerebral
- NSE - Enolase Neuro Específica, do inglês *neuron-specific enolase*
- PCR - Proteína –C reactiva
- PCT - Procalcitonina
- PLT- Plaquetas
- PRL- Prolactina
- PVX - *PolyViteX*
- RBC - *Red blood cells*
- RDW –*Red cell distribution width*
- RIA -Rádio Imuno Ensaio
- RIQAS – *Randox international quality assessment scheme*
- Real time-PCR - Real Time–Polymerase Chain Reaction
- RPR – Reagina Plasmática rápida
- SCC - Antígeno do Carcinoma de Células Escamosas, do inglês *Squamous Cell Carcinomas*
- sHBG- Globulina transportadora de Hormona sexuais, do inglês *Sex hormone-binding globulin*
- SPC - Serviço de Patologia Clínica
- TIBC- Capacidade de fixação do ferro, do inglês *Total iron-binding capacity*
- TG - Tiroglobulina
- TEL- Testosterona livre
- TP - Tempo de Protrombina
- TPO – Anticorpos anti-peroxidase, do inglês *Antithyroid Peroxidase*
- TPS - Antígeno polipeptídico específico tecidual, do inglês *Tissue polypeptide specific antigen*
- TPSA - Antígeno Específico da Próstata,do inglês *Prostatespecific antigen*
- TSA – Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos
- TSH - Hormona Estimuladora da Tiróide, do inglês *Thyroid stimulating hormone*
- TT- Tempo de Trombina
- UFC - Unidadesformadoras de colónias

- UK-NEQAS - United Kingdom National External Quality Assessment Service
- VCS - Volume, Condutividade e *Scatter*/dispersão
- VCM – Volume Corpuscular Médio
- VS- Velocidade de Sedimentação
- WBC –*White blood cells*

Resumo

É recomendado começar a montar um puzzle pelos quatro cantos do retângulo. Descobrimos o local correto das peças pelos tons que a constituem e pela sua forma.

Deste modo, as quatro valências das análises clínicas: a bioquímica, a microbiologia, a hematologia e a imunologia; funcionam para o médico como a forma e a cor funcionam para quem está a montar o puzzle. É, a partir da informação conseguida pelos testes e observações realizadas no laboratório, que o médico fica com a capacidade de fazer um diagnóstico.

Os laboratórios clínicos têm assim a função de “transformar” as variadas amostras em valores que o clínico vai interpretar e confirmar ou não o diagnóstico de que suspeitava.

Tive a oportunidade de realizar o estágio curricular no Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil. Nestes sete meses vivi o quotidiano de uma rotina hospitalar onde enriqueci e desenvolvi conhecimentos (teóricos e práticos) nas quatro valências das análises clínicas. Neste relatório retrato a minha experiência neste estágio e nos respectivos sectores referidos anteriormente. O sector de microbiologia e de hematologia despertaram um interesse particular em mim, e por isso, tive a oportunidade de aprofundar os meus conhecimentos nestas duas valências.

Descrevo ainda o controlo de qualidade realizado nestes sectores, uma atividade que contribui para garantir que as determinações realizadas sejam credíveis e fiáveis.

Abstract

It is recommended to start building a puzzle by the four corners of the rectangle. The correct places for the pieces are discovered parts of by their shape and colors.

Thus the four valences of clinical analysis: biochemistry, microbiology, hematology and immunology; work for the doctor as the shape and color work for anyone building the puzzle. It is based on information obtained by tests and observations made in the laboratory that the doctor gets the ability to make a diagnosis or confirm suspicions thereof.

Clinical laboratories as well have a role in "transforming" the varied samples in quantities that the doctor will interpret and use to make a diagnosis.

I had the opportunity to perform the curricular training in Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil in Coimbra. In these seven months I lived the daily routine of a hospital where I enriched and developed knowledge (theoretical and practical) in the four valences of clinical analysis. This report describes my experience in this curricular training in the sectors mentioned above. The sectors of microbiology and hematology awakened particular interest in me, and so I had the opportunity to deepen my knowledge in these two areas .

It is also described the quality control carried out in these areas, which helps to ensure that the determinations are credible and reliable.

I. INTRODUÇÃO

O cancro é considerado uma das principais doenças do século XXI. É responsável por cerca de 25 mil mortes em Portugal, o que o coloca no segundo lugar das causas de morte no nosso país. O facto de o número de casos de doentes oncológicos ter aumentado nos últimos anos, tornou a prevenção, o diagnóstico e a procura pela cura como objetivos primordiais do Sistema Nacional de Saúde. [1]

Como tal, a importância dos Institutos Portugueses de Oncologia (IPO) tem engrandecido nos últimos anos. Os IPOs são centros que prestam serviços relacionados com a oncologia, desde o rastreio, diagnóstico, tratamento até aos cuidados continuados. Além disso, possuem ainda uma vertente relacionada com a investigação e o ensino.

O IPO de Coimbra foi fundado em 1953 pelo Professor Doutor Luís Raposo, numa pequena vivenda que mais tarde foi demolida, tendo os serviços sido transferidos para novas instalações com o intuito de dar uma resposta mais eficiente e eficaz aos doentes.

Além dos cuidados médicos também o bem-estar dos doentes é uma das prioridades do Instituto Português de Oncologia de Coimbra. Sabendo que o cancro é uma doença crónica limitante, que leva ao desgaste físico e mental do doente e das pessoas ao seu redor, torna-se imprescindível ter serviços que consigam dar respostas atempadas e que dignifiquem a necessidade do doente.

O Serviço de Patologia Clínica (SPC) é um dos muitos serviços integrados no IPO de Coimbra, que tem como objectivo obter respostas para ajudar o clínico no diagnóstico, controlo e monitorização dos doentes.

No âmbito do estágio realizado para obtenção do Mestrado em Análises Clínicas, tive a oportunidade de passar pelas quatro áreas do SPC do Instituto Português de Oncologia de Coimbra: Microbiologia, Bioquímica, Hematologia e um sector que engloba a Imunologia, Serologia e a Hormonologia.

Foi uma experiência que me permitiu ter um contato direto com a clínica e com a rotina hospitalar, onde coloquei em prática os conhecimentos teóricos que fui adquirindo ao longo da frequência do Mestrado e alcancei novos saberes devido ao apoio extraordinário que obtive por parte de todos os elementos do Serviço de Patologia Clínica do IPO de Coimbra. Para além de ter contribuído para a minha experiência profissional, este estágio também me permitiu enriquecer pessoalmente. A vivência diária com um meio hospitalar faz-nos crescer e mesmo sem repararmos, as nossas prioridades sofrem pequenas mutações silenciosas que felizmente, contribuem para a nossa evolução.

Neste estágio também tive a oportunidade de visitar as enfermarias, caracterizadas por ambiente denso, carregado de fármacos, de calafrios, onde, por vezes, somos vistos como uma forma de consolo, alguém com quem o doente pode falar e aí a sensação de conseguirmos tornar o peso do cancro mais leve durante cinco minutos é uma lufada de ar fresco.

A sala de colheitas foi outro local que me conferiu a vivência direta com o doente. Aqui estes não se encontravam tão frágeis, mas muitas das vezes ainda revoltados e onde a expressão “porquê isto a mim” era dita e sentida frequentemente.

Dos vários sectores onde estive durante pelo menos um mês a absorver saberes e a desenvolver competências, escolhi dois para aprofundar: o da Microbiologia e o da Hematologia. É uma paixão antiga o fascínio sentido pela Microbiologia, que nem sempre é visível a olho nu mas que tem uma importância no nosso quotidiano inversamente proporcional ao seu tamanho. Por outro lado, a Hematologia, é uma área deslumbrante, com um poder enorme na decisão do clínico, que também cativou o meu interesse desde o primeiro dia no sector.

2. CARACTERIZAÇÃO DO SERVIÇO DE PATOLOGIA CLÍNICA

O serviço de patologia clínica do IPO de Coimbra localiza-se no Edifício da Oncologia Médica, sendo o Dr. Frederico Monteiro Valido o atual responsável pelo serviço no qual trabalham 28 pessoas.

O número de doentes que o serviço atende diariamente compreende, por norma, os 250 e os 300 pacientes. O primeiro contacto do doente com o SPC ocorre na receção/secretaria. Neste local é realizado o registo informático do doente a partir do número do seu processo e o registo das análises pedidas pelo médico. Cada doente recebe um número e uma letra de A a G que corresponde ao dia da semana (sendo o A a letra correspondente a segunda-feira e o G a domingo).

Existe ainda uma sala onde são realizadas as colheitas de sangue por parte dos técnicos superiores aos doentes de ambulatório e onde os doentes entregam os produtos que são colhidos em casa (como por exemplo, urina de 24horas). As amostras que provêm do internamento também são rececionadas na sala e sofrem o mesmo processo de registo.

Após o registo e a colheita das amostras, estas são distribuídas pelas diferentes áreas do SPC: Microbiologia, Bioquímica, Hematologia e um sector que engloba a Imunologia, Serologia e a Hormonologia.

Devido à existência de quatro valências tão distintas, há uma grande diversidade de produtos que são tratados no SPC. A amostra mais comum e que é utilizada na maioria dos sectores é o sangue/soro, mas existem outro tipo de amostras como a urina que é a amostra mais frequente no sector de Microbiologia, mas também é utilizada para a determinação de metabolitos noutros sectores. Com menos frequência aparecem amostras tecidulares como os gânglios e as biopsias.

De forma a dar uma resposta eficiente e rápida, o SPC possui vários equipamentos que facilitam o trabalho dos especialistas e técnicos. Na tabela I, estão indicados os equipamentos que fazem parte do laboratório.

Tabela 1. Equipamentos existentes no SPC do IPO de Coimbra

HEMATOLOGIA	Test I BCL da ALI FAX®
	LH 750 Beckman Coulter
	Cytomics fc 500 Beckman Coulter
	Aerospray® 7150 Hamtology Slide Stainer Cytocentrifuge da WESCOR®
	GeneXpert® da Cepheid (equipamento partilhado)
ACL TOP® CTS 500 da Instrumentation Laboratory	
BIOQUÍMICA	RapidLab® 1265 da Siemens™
	RapidChem™ 744 da Bayer™
	Reflotron® Plus da Roche Diagnostic™
	Cobas® 6000 da Roche Diagnostic™
	Cobas® c311 da Roche Diagnostic™
	ABL 800 Flex da Radiometer® (2)
	Shimadzu Spectrophotometer UV-120-02
MedicaPro	
IMUNOLOGIA, SEROLOGIA E HORMONOLOGIA	Cobas e601 Analyser® da Roche™
	Liaison® da DiaSorin™
	Centaur® da Siemens™
	Kryptor® Brahms™
	Immulite 2000 XPi® da Siemens™
	Immulite 2000® da Siemens™
	BN-pró Spec® da Siemens™
	VIVA- E® da Siemens™
	ImmunoCAp® da ThermoScientific™
	Hydrasis® da Sebia™
	LKB Wallac 1272 Clini Gamma Counter
MICROBIOLOGIA	BD Bactec™ 9050 Blood Culture System
	Vitek®2 Compact 15 da bioMérieux™
	Cobas® u411 da Roche Diagnostic™
	ATB Expression® da bioMérieux™
	Câmara de fluxo laminar Forma Scientific
GeneXpert® da Cepheid (equipamento partilhado)	

2.1. Sector de Microbiologia

Neste sector faz-se a análise bacteriológica, micológica e parasitológica de diversas amostras.

É um sector que ainda tem uma grande vertente de trabalho manual, desde a sementeira dos diversos produtos, às colorações, à observação ao microscópio e ainda à realização dos antibiogramas.

As diversas amostras requerem uma colheita, um transporte e um processamento especializados/adequados.

i) **Urina**

As infeções do trato urinário são as mais comuns na população. A mulher, devido a razões anatómicas e fisiológicas, tem uma maior predisposição para este tipo de infeções.

Quando a infeção se localiza na bexiga é designada como cistite, por sua vez se atingir o trato urinário superior designa-se por pielonefrite.

A colheita da urina para a realização da urocultura segue alguns princípios. Na maioria dos casos é o próprio doente que faz a colheita, pois deve ser a primeira urina da manhã e só deve compreender o jato intermédio da urina. [2]

Existem outros métodos de colheita de urina:

- Punção de cateter urinário;
- Punção supra-púbica;
- Saco coletor em crianças;
- Drenagem de nefrostomia /ureterostomia.

A análise da urina divide-se em duas partes. Uma é a análise sumária também designada de análise de urina do tipo II, que permite avaliar a presença ou ausência de determinados parâmetros como proteínas, nitratos, glucose e determinar outros parâmetros como o pH e a densidade. Realiza-se recorrendo a tiras impregnadas de reagentes, designadas de *Combur Test*. A tira é mergulhada na urina, escurrida e a cor correspondente a cada reacção química é avaliada no equipamento apropriado, o Cobas u411. Para este exame químico, é utilizada urina não centrifugada. Realiza-se também uma análise macroscópica à urina onde se avalia a sua cor e turvação.

Para além desta avaliação, é realizado o exame direto a fresco, ou seja, a observação ao microscópio do sedimento urinário após centrifugação da urina. Este exame serve para

averiguar a existência de leucócitos, células epiteliais, eritrócitos, cilindros e cristais. Deve ser efetuado utilizando uma ampliação de 10x; mas no caso de existirem cilindros, deve ser utilizada uma ampliação de 40x. [2] Por razões práticas esta análise química da urina é realizada no sector de Microbiologia e não no sector de Bioquímica.

A outra parte da análise da urina designa-se por urocultura e consiste na quantificação dos microrganismos presentes na urina. A urina é semeada em dois meios de cultura, CLED (cistina, lactose, défice em electrólitos) e CNA (Colistina e Ácido nalidíxico) segundo dois planos perpendiculares, utilizando uma ansa calibrada de 10 μ L. Os meios são incubados em aerobiose, a 37°C durante 18 a 24 horas. [3]

É no meio CLED que se realiza a análise quantitativa, sendo consideradas positivas as amostras com uma quantidade de colónias superior a 10⁵ UFC/mL (1000 colónias quando se utiliza uma ansa calibrada de 10 μ l). Amostras que contêm mais de 3 colónias diferentes e têm uma contagem inferior a 10⁵ UFC/mL são consideradas polimicrobianas/contaminação. [2]

O meio CLED contém lactose, que permite diferenciar os microrganismos fermentadores dos não fermentadores, uma vez que, quando os microrganismos realizam a fermentação da lactose acidificam o meio e este muda de cor, de azul para amarelo. As bactérias não fermentadoras apresentam-se na forma de colónias azuis, verdes ou incolores enquanto as fermentadoras adquirem uma cor amarela. O facto de este meio ser deficiente em electrólitos impede o *swarming* de microrganismos como é o caso do *Proteus spp.* [2;3;4]

O meio CNA é um meio seletivo que possui dois antibióticos na sua composição, o ácido nalidixico e a colistina que impedem o crescimento de bactérias Gram negativo, sendo por isso considerado um meio seletivo para bactérias Gram positivo. O facto de conter sangue de carneiro, permite verificar a ocorrência de hemólise. [3]

ii) Hemoculturas

O sangue é um tecido líquido estéril e a presença de microrganismos é sempre de valorizar. Daí a importância da sua deteção o mais rápido e rigorosamente possível.

Para a colheita destas amostras é necessário um cuidado redobrado para minimizar a probabilidade de contaminação, por isso o local de punção deve ser desinfetado com dois desinfetantes diferentes. [2;5] As amostras de sangue são inoculadas em frascos de cultura (hemoculturas), que contém um meio líquido com tripticase de soja. A quantidade de sangue colhida deve variar entre os 6 e os 10 mL, mantendo a proporção de 1:5

relativamente ao meio. [2] Os frascos de cultura são colocados no sistema automatizado, *BD Bactec™ 9050 Blood Culture System*. Este equipamento deteta o crescimento microbiano através do aumento de fluorescência causado pela libertação de CO₂ que resulta da metabolização dos substratos presentes no meio pelos microrganismos. Quando ocorre metabolização dos substratos, há produção de CO₂ e conseqüentemente há alteração da fluorescência que é detetada pelo equipamento. [3;5] Não havendo crescimento bacteriológico, as amostras ficam no sistema automatizado durante 7 dias, tempo após o qual se conclui a sua negatividade. No caso de amostras para pesquisa micológica, estas devem cumprir um período de incubação de 14 dias, em frascos próprios para o efeito, até serem dadas como negativas.

Quando as amostras são positivas realiza-se um exame direto e subculturas para um meio sólido a partir dos frascos de hemoculturas. No caso do exame direto, as amostras são coradas pela técnica de Gram e observadas ao microscópio. Para a realização da subcultura as amostras são semeadas em meio de gelose de sangue (COS) pela técnica de esgotamento do produto à superfície do meio sólido, e incubadas em atmosfera de CO₂ (capnofilia) a 37°C até 48h. [2] A gelose de sangue é um meio diferencial que permite o crescimento de variados microrganismos incluindo os microrganismos fastidiosos, para além de que possibilita a visualização da hemólise uma vez que tem como suplemento o sangue de carneiro que fornece o fator X (heme). [3]

iii) Fezes

O trato gastrointestinal, principalmente o intestino e o cólon são zonas ricas em flora microbiana. Por vezes, e apesar da existência de barreiras naturais do organismo contra os microrganismos invasores, ocorrem perturbações gastrointestinais. Frequentemente os médicos generalistas deparam-se com casos de diarreia aguda.

A amostra deve ser colhida para um recipiente estéril e não deve sofrer refrigeração. Devem ser colhidas amostras em três dias consecutivos, pois a emissão dos microrganismos não é contínua. [2;3] Por rotina, nestas amostras realiza-se uma coprocultura, que consiste num exame bacteriológico para pesquisa de *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* e *Campylobacter spp.*. Caso haja necessidade de pesquisar outros microrganismos o laboratório deve ser informado.

As amostras para pesquisa de *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* são semeadas em meio Hektoen (HEK) pela técnica de esgotamento do produto à superfície e incubadas em aerobiose, a 37° durante 24 horas. O HEK é considerado um meio seletivo e diferencial.

Este meio é constituído por sais biliares que inibem o crescimento de bactérias Gram positivo e de algumas bactérias Gram negativo, tendo ainda na sua composição três hidratos de carbono, a lactose, a sacarose e a salicina que não são utilizados pela *Shigella spp.* nem pela *Salmonella spp.* permitindo dessa forma a diferenciação destes microrganismos relativamente a outros que os utilizam como a *Escherichia coli*. A fucsina ácida e o azul de bromotimol funcionam como indicadores de pH, sendo que na presença de microrganismos fermentadores o meio muda de cor para salmão/amarelo. No caso dos microrganismos não fermentadores, como é o caso das bactérias que pesquisamos neste exame, mantém-se inalterado.

Este meio possui ainda tiosulfato de sódio e citrato de amónio férrico, que permitem a produção de H₂S por parte da *Salmonella spp.*, surgindo as colónias com um centro negro sendo assim possível distingui-la da *Shigella spp.*. [3]

As amostras são ainda inoculadas em Caldo de Selenito e incubadas em aerobiose a 37°C. Este caldo é um meio seletivo para *Shigella spp.* e *Salmonella spp.* nas primeiras 24 horas, uma vez que é tóxico para a maioria das *Enterobacteriaceae*. Após esse período perde a selectividade. [2;3]

No caso da pesquisa do *Campylobacter spp.*, a amostra tem de ser semeada em meio CAMP, um meio seletivo para este microrganismo, que inibe o crescimento da flora normal comensal do trato gastrointestinal devido à presença de antibióticos e antifúngicos no meio. A amostra deve ser incubada a 42°C, durante 72 horas em microaerofilia, no entanto deve proceder-se à sua análise às 24 horas e às 48 horas. [3]

Para o diagnóstico rápido de *Campylobacter spp.* é utilizado um teste imunocromatográfico o RIDA® Quick *Campylobacter*, que se baseia na deteção qualitativa de antígenos do *Campylobacter jejuni* e do *Campylobacter coli*.

O *Clostridium difficile* é uma bactéria responsável por colites pseudomembranosas e diarreias graves devido à associação de antibióticos, uma vez que estas associações de antibióticos diminuem a flora comensal permitindo a proliferação deste microrganismo. O *Clostridium difficile* produz duas toxinas: a toxina A, que é uma enterotoxina e a toxina B que é uma citotoxina. Estas toxinas são responsáveis por causar danos no hospedeiro.

No sector de Microbiologia do IPO de Coimbra a pesquisa de *Clostridium difficile* só é efetuada em amostras diarreicas e em situações pedidas por parte do especialista. É utilizado o teste RIDA® Quick *Clostridium difficile* GDH como teste de triagem. É um teste imunocromatográfico que permite a deteção qualitativa de glutamato desidrogenase do *Clostridium difficile*. As amostras que são positivas, segundo este teste, são

posteriormente analisadas no GeneExpert que pesquisa a toxina B pelo método de real time- PCR. [7]

No caso dos exames parasitológicos, também devem ser colhidas três amostras em dias consecutivos, para contentores secos e sem misturar as amostras. A amostra não deve vir contaminada com urina. Primeiramente, é realizado um exame macroscópico, onde é avaliada a consistência, a cor, a presença de muco ou sangue e a presença de parasitas. Posteriormente é realizado um exame microscópico após concentração da amostra pelo método de Ritchie, que permite concentrar num pequeno volume, ovos, quistos, larvas que se encontram numa maior quantidade de fezes. [5]

Por vezes, também é pedida a pesquisa de sangue oculto nas fezes. Esta análise é efetuada recorrendo ao *Chemtrue*® teste One-Step FOB, que é um teste rápido, imunocromatográfico que permite, através da observação da respetiva tira, a deteção da presença de hemoglobina humana nas amostras fecais. Auxilia no diagnóstico de perturbações gastrointestinais inferiores como o caso do cancro cólo-rectal, pólipos e adenomas.

O dispositivo para a realização do teste contém uma tira que se encontra revestida com um anticorpo anti-hemoglobina humana na região T (teste) e um anticorpo de cabra anti-rato na região C (controlo). A amostra é colocada num poço que contém um anticorpo anti-hemoglobina. Esta mistura ascende ao longo da membrana cromatográfica por capilaridade. Os testes são considerados positivos, quando aparece uma banda colorida na zona T. A fiabilidade do teste é indicada pelo aparecimento de uma banda colorida na zona C.

Na figura 1 estão representados os vários resultados que podemos obter neste teste.

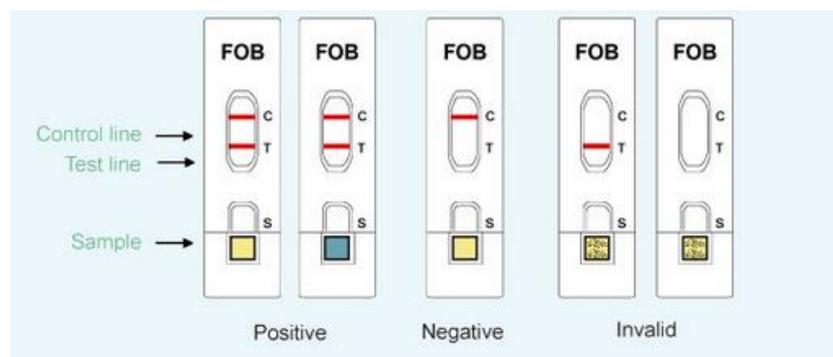


Figura 1. Representação dos possíveis resultados do teste de pesquisa de sangue oculto utilizando o *Chemtrue*® teste One-Step FOB
(Fonte: <http://www.inter-chemical.com/products.asp?ID=39>)

iv) Expectoração e outras secreções respiratórias

O sistema respiratório apresenta variados mecanismos de defesa contra as infecções: tosse, cílios nasais, secreções de factores antimicrobianos.

Apesar da maior parte das infecções respiratórias surgir em picos sazonais, este tipo de amostra chega ao laboratório todo o ano.

Para o estudo de infeções do tracto respiratório há uma grande variabilidade de amostras:

- Expectoração;
- Aspirados brônquicos;
- Lavado/Escoado brônquico.

A amostra de expectoração é a mais frequente. A colheita deve ser realizada logo pela manhã, pois durante a noite as secreções acumulam-se nas vias respiratórias obtendo-se uma amostra mais rica. Também devem ser colhidas três amostras em dias consecutivos, pois a emissão de alguns microrganismos não é contínua.

As amostras são observadas ao microscópio após coloração de Gram, sendo que a qualidade da mesma é definida pela presença de leucócitos e células epiteliais. Na observação através da ampliação de 10x, seguindo as diretrizes das Tabela de Murray e Washington (consultar anexos), amostras contendo pelo menos 25 leucócitos e no máximo 10 células epiteliais devem ser aceites para a análise e observadas na ampliação de 50x de imersão, como é o caso da amostra apresentada na figura 2. Por outro lado, amostras que contêm mais de 25 células epiteliais por campo devem ser rejeitadas, como é o caso da amostra apresentada na figura 3. [2]

Estas amostras são semeadas pela técnica de esgotamento do produto à superfície do meio sólido em três meios de cultura: COS, PolyviteX (PVX) também designada como gelose de chocolate e em gelose de Sabouraud com cloranfenicol e gentamicina.

O PVX é um meio enriquecido não seletivo que se destina ao crescimento de microrganismos mais exigentes, é uma variante da gelose de sangue onde os eritrócitos se encontram lisados após aquecimento a 60 °C. [5;6] O facto dos eritrócitos estarem lisados permite o crescimento dos *Haemophilus*, pois estes microrganismos necessitam de dois factores de crescimento, o Factor X (heme) e Factor V (NAD) que estão presentes no interior dos eritrócitos e, após a lise destes, estes factores são libertados, podendo ser utilizados pelos microrganismos. [6]

O meio de Sabouraud com cloranfenicol e gentamicina é um meio com elevadas concentrações de hidratos de carbono, que favorece o crescimento de diversos fungos leveduriformes e filamentosos.

Os três meios, COS, PVX, e Sabouraud com cloranfenicol e gentamicina após serem semeados devem ser incubados em aerobiose, a 37°C durante 24 horas.

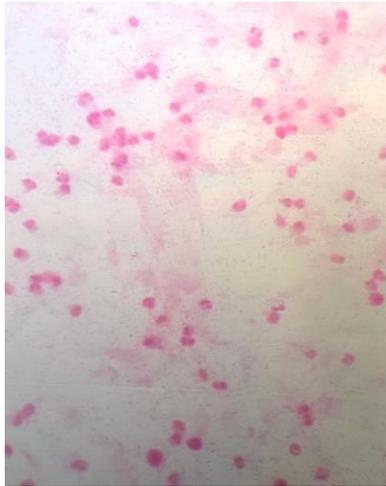


Figura 2. Gram de uma secreção respiratória de boa qualidade: elevado número de leucócitos e flora bacteriana abundante
(Fonte: SPC do IPO de Coimbra)

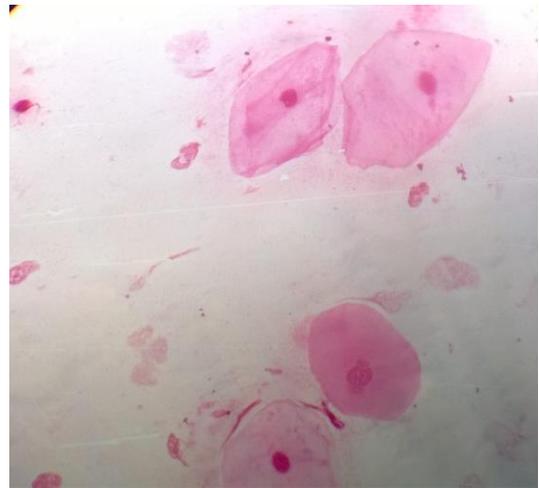


Figura 3. Gram de uma secreção respiratória de fraca qualidade: observa-se um elevado número de células epiteliais
(Fonte: SPC do IPO de Coimbra)

v) Exsudados (genitais, auriculares, de feridas)

Os exsudados vaginais são colhidos com o auxílio de uma zaragatoa que deve ser transportada no meio de *Stuart* modificado.[3] A amostra é semeada em COS, PVX e em meio de Sabouraud com cloranfenicol e gentamicina. [2] O processamento deste tipo de amostras inclui ainda um exame direto a fresco com observação entre lâmina e lamela com 0.5% de NaCl utilizando a ampliação de 40x e um exame direto após coloração de Gram utilizando a ampliação de 50x de imersão. O objetivo do exame a fresco é a observação de leucócitos, flora (no caso da *Trichomonas vaginalis* é possível verificar o movimento da mesma devido ao facto de possuir flagelos) e de *clue cells* (apresentadas na figura 4), células epiteliais cobertas de bactérias que são comuns em infeções por *Gardnerella vaginalis* e *Mobiluncus spp.*. Na coloração de Gram, podemos observar leucócitos, flora microbiana existente e *clue cells*. [3]



**Figura 4. Presença de Clue cells num exsudado vaginal
(Fonte: SPC do IPO de Coimbra)**

Outro teste utilizado para a identificação destes microrganismos, é o teste de Whiff (teste deKOH). É um teste simples, que consiste em confirmar se após a adição de KOH a 10% à amostra surge um cheiro púrfido característico. Se sim, o teste é dado como positivo. [3]

Os exsudados purulentos que provêm de feridas, abscessos, fistulas (etc.), colhidos com zaragatoa são semeados em gelose de sangue, gelose de chocolate e em gelose de Sabouraud com cloranfenicol e gentamicina e incubados em aerobiose, a 37°C, durante 24 horas. É realizado apenas o exame direto com coloração de Gram. [2]

Caso a amostra seja colhida e transportada em condições de anaerobiose, ou seja, a amostra é colhida em agulha e colocada no *Portagerm*TM deve realizar-se a pesquisa de microrganismos anaeróbios. O *Portagerm*TM é um meio de transporte em forma de gelose tamponada que contém um reagente redutor. Este agente redutor, a resazurina, permite detetar a presença ou ausência de oxigénio, pois na presença de O₂ é oxidado e apresenta uma coloração azul.

Estas amostras devem ser inoculadas em meio Schaedler gelificado e incubadas em atmosfera anaeróbica (deve ser realizado um controlo numa atmosfera aeróbia). Este meio é utilizado para o isolamento de anaeróbios estritos, sendo altamente nutritivo (possui hemina e L-cisteína), e não sendo um meio seletivo.

Se a visualização ao microscópio da amostra colhida em zaragatoa sugerir a presença de microrganismos anaeróbios, também se deve semear a amostra em meio Schaedler gelificado. [3]

vii) Outros líquidos biológicos

O líquido cefalorraquidiano (LCR) é considerado uma amostra urgente, pois a infecção das meninges é uma infecção grave com uma elevada probabilidade de morte e por isso o seu processamento deve ser imediato.

O LCR é colhido por punção lombar e deve ser imediatamente transportado para o laboratório sem refrigeração. O aspeto macroscópico do líquido deve ser tido em atenção.

A centrifugação é idêntica para todos os líquidos, 10 minutos a 3.000 x g. Após a centrifugação realiza-se o processamento das amostras. [2]

Os sedimentos das respetivas amostras devem ser semeados em meios COS, PVX e no meio de Sabouraud com cloranfenicol e gentamicina. A incubação deve ser em aerobiose, a 35°C – 37°C durante 24 horas em capnofilia. Também é, sempre, preparado um esfregaço que é corado pela técnica de Gram e observado ao microscópio. Devido ao facto de serem líquidos estéreis, qualquer microrganismo que seja observado é valorizado. [2;3]

vi) Ponta de cateter

A ponta de cateter deve ser transportada num contentor seco e deverá medir 4 cm para efeito de padronização e valorização das culturas. No laboratório é semeada em gelose de sangue por rolamento do cateter no meio de cultura. São consideradas positivas, as culturas que, após 24h apresentem no mínimo 15 colónias (se o cateter medir os 4cm). [2] O cateter é colocado em Caldo de Schaedler, e após 24 horas é repicado para gelose de sangue (COS). Caso apresente turvação é preparado um esfregaço para ser corado pela técnica de Gram.

O Caldo de Schaedler tem uma composição semelhante ao meio Schaedler em gelose. Possui na sua composição hemina, extrato de levedura, vitamina K3, L-cistina e glucose em elevadas concentrações que facultam o crescimento de microrganismos fastidiosos/anaeróbios. [3]

vii) Biópsia para pesquisa de *Helicobacter pylori*

As amostras para pesquisa de *Helicobacter pylori* são enviadas para o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA). Estas amostras são obtidas a partir de uma biópsia gástrica de indivíduos que têm uma elevada probabilidade de serem portadores, ou de

indivíduos que já estão rastreados como tal. São transportadas em *Portagerm pylori*, um meio semi-geloso constituído por uma base peptonada, por elementos que permitem a conservação do microrganismo e por uma mistura de antibióticos que impedem o crescimento e a proliferação de microrganismos pertencentes à flora da orofaringe.

Seguem para o INSA em contentores refrigerados e cumprindo as regras de segurança impostas.

EXAME MICOBACTERIOLÓGICO

Outro exame realizado no sector de microbiologia é a pesquisa de micobactérias, bacilos ácido - álcool resistentes (BAAR). Nas amostras em que é pedido este exame, é preparado um esfregaço diretamente a partir do produto para ser corado pela técnica de Kinyoun (Ziehl-Neelsenmodificada). Esta técnica é a recomendada pois preserva as condições morfológicas dos bacilos ácidos – álcool resistentes e, além disso, como não ocorre aquecimento dos reagentes, não há libertação de vapores tóxicos que podem ser inalados por parte do profissional de saúde que executa a técnica.

Na figura 5 é apresentado um exame direto corado pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada onde é possível observar os bacilos ácido – álcool resistentes com uma coloração avermelhada.

Para além do esfregaço direto, é ainda preparado outro a partir da homogeneização da amostra. Este processo é realizado utilizando o *kit* NALC Decontamination BOX 1.0. A amostra homogeneizada é semeada no meio de Lowenstein-Jensen. Este meio é utilizado para o isolamento e cultura de micobactérias, e tem na sua composição ovo e verde de malaquite que funciona como inibidor do crescimento de bactérias Gram positivo e negativo. O desenvolvimento das micobactérias é lento e por isso exige períodos de incubação prolongados, cerca de 6 semanas a 37°C, sendo que as amostras são observadas semanalmente. Durante este período podem surgir colónias características de cada espécie, por exemplo, as colónias do *Mycobacterium tuberculosis* apresentam um aspeto semelhante ao de uma couve-flor. [3;6]

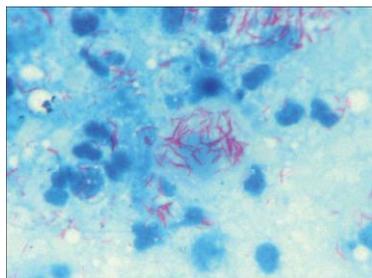


Figura 5. Observação de micobactérias (Fonte: <http://www.atmph.org/>)

EXAME MICOLÓGICO

Com bastante menos frequência, o laboratório recebe amostras em que é pedido apenas o exame micológico. Estas amostras compreendem raspados de unhas, pele, cabelo, entre outros produtos.

Antes do exame cultural destas amostras procede-se ao exame directo a fresco, entre lâmina e lamela, para a detecção da presença de fungos.

Posteriormente as amostras são semeadas em meio de cultura de Sabouraud com cloranfenicol e gentamicina; a temperatura de incubação depende do microrganismo de que se suspeita, podendo ser de 25°C, 37°C ou 42°C. Nos meios de cultura em que ocorre crescimento, caso se observe o crescimento de fungos filamentosos, estes são observados ao microscópio entre lâmina e lamela após preparação com lactofenol ou com KOH a 20% pela técnica da fita-cola. Esta observação microscópica tem como objetivo observar as características do fungo relativamente às suas estruturas: hifas (septadas ou asseptadas), vesículas, macro e microconídeos, esporos que auxiliam na identificação do fungo. Este exame a fresco deve ser observado com a objetiva de 40x e com o condensador ligeiramente para baixo. Caso se dê o crescimento de fungos leveduriformes estes são observados ao microscópio após serem corados pela técnica de Gram e podem ser identificados por métodos automatizados. [3]

A cor que o fungo apresenta no meio de cultura, a cor do seu reverso e a temperatura a que ocorre o seu crescimento também são características que permitem a identificação.

Quando a suspeita de infeção recai sobre fungos filamentosos e dermatófitos é utilizado o meio Mycoline. [3] Este meio é constituído por uma lâmina gelatinosa com meios diferentes em cada lado. De um dos lados, a gelose é constituída por Sabouraud com gentamicina e cloranfenicol e apresenta uma coloração amarelada. A gentamicina inibe o crescimento de quase todas as bactérias Gram positivo e Gram negativo. Por sua vez, o cloranfenicol reforça a seletividade do meio no caso das estirpes resistentes à gentamicina.

Do outro lado da lâmina, o meio é composto pela gelose de Sabouraud com cloranfenicol e actidiona. Este lado apresenta uma coloração alaranjada.

A actidiona inibe o crescimento dos fungos saprófitas.[8]

Quando ocorre o crescimento de dermatófitos, o meio altera de cor, para vermelho, por alcalinização do mesmo na presença de vermelho de fenol.

ATMOSFERAS SELETIVAS

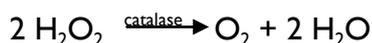
Existem microrganismos que exigem condições especiais de crescimento, ou cujo crescimento é favorecido pelas mesmas. Nestes casos são utilizadas atmosferas com características especiais conseguidas pela utilização do GENbag e de geradores específicos. O GENbag consiste num envelope de plástico, em que é colocado um gerador específico da atmosfera que se pretende criar. A atmosfera anaeróbia tem uma concentração de O₂ inferior a 0.1% ao fim de 2 horas e meia e uma concentração de CO₂ superior a 15% após 24 horas. Nesta atmosfera é necessário adicionar um indicador, que permite controlar se a reação de anaerobiose foi bem sucedida e se foi mantida durante a incubação.

Para bactérias microaerofílicas, a concentração de O₂ conseguida no GENbag varia entre os 5.5% e os 12% após 24 horas; no caso de bactérias capnofílicas, a concentração de CO₂ varia entre os 3.5% e os 9.5% após 24 horas.

PROVAS DE IDENTIFICAÇÃO

Neste sector, são ainda realizados testes rápidos e simples que permitem identificar/diferenciar microrganismos.

- **Teste da Catalase:** para a deteção desta enzima, coloca-se uma gota de peróxido de hidrogénio (H₂O₂) a 3% e, com o auxílio de uma ansa adiciona-se uma colónia do microrganismo a testar. Caso o teste seja positivo, a catalase acelera a libertação de O₂ a partir do peróxido de hidrogénio (H₂O₂) resultando na libertação de gás. É um teste utilizado principalmente para diferenciar *Staphylococcus spp.* de *Streptococcus spp.*, uma vez que os *Staphylococcus spp.* são catalase positiva e os *Streptococcus spp.* não. Existem ainda outros microrganismos que são catalase positiva como por exemplo, *Listeria monocytogenes* e *Corynebacterium* são alguns exemplos.[3]



- **Teste da Oxidase (Método de Kovac's):** é um teste utilizado para a deteção da presença da enzima citocromo oxidase. São utilizados discos impregnados com tetrametil-p-fenilenodiamina. Com o auxílio de uma ansa, coloca-se sobre o disco uma colónia do microrganismo a testar. O teste é considerado positivo se o disco

adquirir uma cor púrpura. As *Enterobacteriaceae* são negativas para este teste, ao contrário das *Pseudomonas spp.*[3]

- **Teste da Urease:** utilização de um meio de cultura ureia-indol e posterior inoculação com o microrganismo a testar. Se ocorrer a hidrólise da ureia por ação da urease com produção de amónia, o meio fica alcalino, mudando de cor de amarelo para carmim devido ao indicador de pH do meio. O *Proteus spp.* realiza a hidrólise da ureia. [3]
- **Teste da Coagulase livre (em tubo):** permite estudar a capacidade que o microrganismo tem em formar coágulos quando adicionado ao plasma. A coagulase converte o fibrinogénio em fibrina, conseqüentemente ocorre a formação do coágulo. A formação ocorre num período de 4 horas a 35°C-37°C. A importância clínica deste teste recai sobre o facto de que, permite-nos distinguir o *Staphylococcus aureus*, que é coagulase positiva de outros *Staphylococcus spp.*[3]
- **Teste de resistência à Novobiocina:** este teste consiste na utilização de discos de papel impregnados com novobiocina, que permitem distinguir *Staphylococcus spp.* coagulase negativa. Para a realização deste teste é necessário preparar um inóculo das colónias dos *Staphylococcus spp.*, a analisar numa solução salina, com uma turvação correspondente a 0.5 na escala MacFarland. Em seguida semear a suspensão no meio de Muller-Hinton de modo a que todo o meio seja inoculado em três planos. Por fim, colocar o disco de novobiocina e incubar durante pelo menos 18h a 35°C - 37°C. A principal aplicação deste teste recai na distinção do *Staphylococcus saprophyticus* que é resistente à novobiocina de outros *Staphylococcus spp.* coagulase negativa como é o caso do *Staphylococcus epidermidis*, que é sensível. [9]
- **Teste de resistência à Bacitracina:** este teste consiste na utilização de discos de papel impregnados com bacitracina, que permitem diferenciar o *Streptococcus pyogenes* (sensível à bacitracina) dos outros *Streptococcus β* - hemolíticos. O teste executa-se de forma semelhante à do teste de resistência à novobiocina. [10]
- **Teste de resistência à Optoquina:** a optoquina é um derivado de quinina que inibe o crescimento do *Streptococcus pneumoniae* em baixas concentrações. Assim

permite distinguir o *Streptococcus pneumoniae* de outros *Streptococcus* α -hemolíticos. [3]

- **AVIPATH® STREP:** consiste num teste de aglutinação que permite agrupar as estirpes de *Streptococcus spp.* β -hemolíticos em diferentes grupos serológicos designados de grupos de Lancefield (A, B, C, D, F, G). [3] Os *Streptococcus spp.* possuem antígenos que permitem distingui-los e classificá-los por grupos. É um teste de aglutinação que se baseia na reação entre o antígeno de superfície do *Streptococcus spp.* e o anticorpo complementar específico de cada grupo presente no látex. Caso haja aglutinação o teste é considerado positivo. [6]
- **BD BBL Crystal Identification Systems:** é um sistema de identificação para bactérias Gram positivo aeróbias. Trata-se de um sistema que utiliza substratos fluorogénicos e cromogénicos que podem ser ou não hidrolisados pelo microrganismo. Quando os substratos fluorescentes são hidrolisados há um aumento de fluorescência que é avaliada por fluorimetria e quando os substratos são cromogénicos a hidrólise é detetada a olho nu devido à alteração de cor. [3]

PROVA DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Após a observação do exame direto (pela coloração de Gram) e do exame cultural é realizada a identificação dos microrganismos pelas cartas correspondentes e também é realizado o antibiograma. Ambos os testes são efetuados no *Vitek®2 Compact 15* da bioMérieux™.

Para a realização da identificação e do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) é necessário preparar uma suspensão em 3ml de solução salina, com a turvação padronizada segundo a escala de McFarland.

Na tabela 2, está indicado qual a carta ID que deve ser utilizada para os diferentes tipos de microrganismos e o respetivo TSA e ainda qual a turvação que a suspensão deve ter.

As culturas a utilizar nas cartas ID devem ter no máximo 48 horas. As cartas têm poços com hidratos de carbono e enzimas que permitem a identificação dos microrganismos. Os TSA são realizados a partir de colónias com 48 horas no máximo. Estas cartas de suscetibilidade são constituídas por poços impregnados com antimicrobianos onde

se determinam as CMI (Concentração Mínima Inibitória), a partir de diluições sucessivas e interpretadas segundo as normas da EUCAST.

Os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão em disco são realizados em meio Mueller-Hinton (MH2), uma vez que o seu baixo teor em timina-timidina diminui a capacidade de crescimento à volta do disco, facilitando a leitura. No caso de se tratarem de microrganismos fastidiosos, utiliza-se o meio de Mueller-Hinton com 5% de sangue de carneiro. O procedimento consiste em semear o meio de cultura com uma suspensão pré-preparada do microrganismo em estudo. A suspensão do inóculo deve ser preparada a partir de colónias recentes e tem que apresentar um valor de turvação correspondente a 0.5 McFarland. O meio deve ser semeado em três planos diferentes. São utilizados discos impregnados com quantidades específicas de antibióticos, que devem ser colocados sobre o inóculo.

Tabela 2. Carta ID e TSA utilizado para determinados microrganismos e indicação da turvação necessária na suspensão para a realização dos mesmos

Gram	CARTA ID	TURVAÇÃO	Microrganismo/ Característica	TSA
Positivo	GP	0.6- 0.63 McF	<i>Staphylococcus spp.</i>	ATB 619
			<i>Streptococcus spp.</i>	ATB ST01
			<i>Enterococcus spp.</i>	ATB 586
Negativo	GN	0.6- 0.63 McF	<i>Enterobacteriaceae spp.</i>	ATB 192
Leveduras	YST	1.8-2.20 McF	Oxidase positiva	ATB 222
				YS07
	ANA	2.70-3.30 McF	Bactérias microaerofilicas, anaeróbias, <i>Corynebacterium</i> , <i>Lactobacillospp.</i>	
	NH	2.70-3.30 McF	<i>Neisseriaspp.</i> , <i>Haemophylusspp.</i> , <i>Campylobacterspp.</i> , <i>Gardnerellavaginallis</i> , e outros microrganismos fastidiosos	

Após o período de incubação, 24 horas, com o auxílio de uma régua ou outro diapositivo, é medido o diâmetro do halo em redor do disco, onde não ocorreu crescimento bacteriano. O laboratório segue as normas EUCAST para interpretar a sensibilidade/resistência dos microrganismos aos antimicrobianos. [3]

- **Meios de cultura cromogénicos**

De forma a comprovar os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos realizados no Sistema Vitek®2 Compact 15 por vezes são utilizados meios de cultura cromogénicos.

É o caso do meio ChromID MRSA, que é um meio de cultura que permite detetar os *Staphylococcus aureus* metilicina – resistentes (MRSA) devido a características do próprio meio de cultura. Neste meio de cultura as colónias de *Staphylococcus aureus* apresentam uma coloração esverdeada devido a uma enzima característica do microrganismos. [11]

Na figura 6 é apresentado o meio Chrom ID MRSA inoculado com uma cultura de *Staphylococcus aureus* metilicina –resistentes.



Figura 6. Meio de culturas Chrom ID MRSA inoculado com *Staphylococcus aureus* metilicina- resistente (Fonte: SPC do IPO de Coimbra)

Outro meio cromogénico utilizado é o chromID ESBL, que permite o rastreio de *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases de espectro alargado (ESBL). Este meio é bastante nutritivo e tem na sua base vários antibióticos incluindo a Cefpodoxima, que é designado como o antibiótico de eleição para detetar as ESBL.

A importância deste meio vai para além da deteção das ESBL, uma vez que além disso, permite distinguir as várias *Enterobacteriaceae* partir da produção de diferentes enzimas por parte destas. Na tabela 3, está representada a coloração que a enterobactéria apresenta no ChromID ESBL e a enzima que é produzida pela mesma. [12]

Na figura 7 é possível observar um meio ChromID ESBL inoculado com uma cultura de *Klebsiella pneumoniae* produtora de β -lactamases de espectro alargado.

Tabela 3. Interpretação do meio ChromID BLSE [8]

Enterobacteriaceae	Cor	Enzima
<i>E.coli</i>	Rosa a cor de vinho	β -glucuronidase
<i>Klebsiella</i>		β -glucosidase
<i>Enterobacter</i>	Verde/azul a verde	
<i>Serratia</i>	acastanhado	
<i>Citrobacte</i>		
<i>Proteus</i>	Cor escura a castanho	Deaminase
<i>Providencia</i>	claro	
<i>Moraganella</i>		



Figura 7. *Klebsiella pneumoniae* em meio BLSE
(Fonte: SPC do IPO de Coimbra)

CONTROLO DE QUALIDADE

O controlo de qualidade externo é realizado sob a matriz do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Por ano, são executados 4 ensaios bacteriológicos, em que cada ensaio corresponde a 4 amostras, 4 ensaios micológicos e 3 ensaios parasitológicos, sendo que cada ensaio compreende 3 amostras.

Para controlo de qualidade interno são utilizadas estirpes ATCC ou estirpes isoladas no próprio laboratório. A assiduidade de realização deste controlo assenta no período de um mês, podendo ser mensal ou semanal se assim se justificar.

Procede-se também ao controlo microbiológico dos meios de cultura, dos reagentes de coloração, das soluções salinas, das superfícies, e do ambiente.

A temperatura das estufas e dos frigoríficos são também controlados e registados.

2.2. Sector de Hematologia

O sector de Hematologia permite auxiliar no diagnóstico e avaliar a ação da terapêutica. Foi um dos sectores que mais prosperou com o avanço da tecnologia. Com esta evolução tecnológica a contagem de células passou a ser realizada em equipamentos automatizados, bem como a determinação da velocidade de sedimentação e as provas de coagulação. Este avanço tecnológico veio permitir que os resultados sejam dados num espaço de tempo muito mais curto que no passado. Esta rapidez é fundamental num Hospital para auxiliar o especialista a decidir que opção adotar relativamente ao doente.

O exame mais frequentemente pedido é o Hemograma Completo, que permite fazer uma análise quantitativa e qualitativa dos leucócitos, eritrócitos e plaquetas.

Para além do sangue, este sector ainda trabalha com outro tipo de amostras, como o LCR e a urina.

HEMOGRAMA

Para a realização do Hemograma, o sangue deve ser colhido de uma veia periférica 8 horas após a refeição, pois os parâmetros podem sofrer alterações devido ao estado nutricional. [13]

A amostra deve ser colocada em tubo com EDTA e permanecer em agitação até ser processada. O EDTA é um quelante do Ca^{2+} impedindo assim a ativação da cascata de coagulação. Este anticoagulante na quantidade correta, não provoca hemólise nem alteração morfológica das células. [14]

O hemograma é realizado num equipamento apropriado, *LH750 Beckman Coulter*. Este autoanalisador hematológico permite melhorar a eficiência do fluxo de trabalho uma vez que não requer uma preparação prévia das amostras. Além disso tem um modo manual que pode ser usado caso a amostra necessite de uma pré – diluição ou caso a quantidade da amostra seja pequena. [15]

Este autoanalisador utiliza diferentes princípios para a realização do hemograma: impedância eléctrica (Princípio de funcionamento *COULTER*), Tecnologia VCS (Volume, Condutividade e Scatter/Dispersão) e espectrofotometria.

O princípio de *Coulter* baseia-se no facto que partículas em movimento num campo eléctrico levam a alterações deste. Estas alterações são proporcionais ao tamanho das partículas. Assim, cria-se um pulso eléctrico que pode ser contabilizado, uma vez que o

número de pulsos indica a quantidade de partículas e a sua amplitude é proporcional ao volume celular. O *LH750 Beckman Coulter* usa este princípio para realizar a contagem de leucócitos, eritrócitos e de plaquetas. São criados histogramas que relacionam o volume com o número de leucócitos, eritrócitos e de plaquetas. [15;16]

A contagem dos eritrócitos e das plaquetas ocorre primeiro, sendo que os elementos celulares que coincidem no intervalo de 2-20 fL são consideradas plaquetas e no intervalo entre 36-360 fL são considerados eritrócitos. Após a lise dos eritrócitos é efetuada a contagem de leucócitos. Na presença de interferências como agregados plaquetares, eritrócitos não lisados ou células imaturas da linha eritroide o autoanalisador tem a capacidade de fazer um ajuste automático da contagem dos leucócitos. [15]

Uma vez realizada a contagem de células o equipamento determina a fórmula leucocitária a partir da tecnologia VCS.

Esta tecnologia determina as subpopulações leucocitárias: neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos; tendo em conta o volume, que é medido por impedância, a condutividade que analisa a composição química das células (ex:granulação) e a dispersão de luz que utiliza um laser de hélio-neon, analisando o volume e a complexidade das células. Com estas leituras são também construído histogramas de dispersão (*Scattergramas*). [15;16]

Com menos frequência é pedido a contagem de reticulócitos. Estes também são contados pela tecnologia de VCS e o resultado é dado em percentagem, representando o número de reticulócitos por 100 eritrócitos. [15;16]

i) Parâmetros eritrocitários

Para além do número de eritrócitos existem outros parâmetros que nos são fornecidos pelo Eritrograma.

A Hemoglobina (Hb) é detetada por espectrofotometria no próprio equipamento e o resultado é dado em g/dL. Este parâmetro encontra-se diminuído em anemias hipocrômicas, como é o caso da anemia provocada por deficiência de ferro. [13]

Existem outros parâmetros que são determinados a partir do histograma. O Volume Corpuscular Médio (VCM) e *Red cell distribution width* (RDW).

O VCM representa o volume médio de cada eritrócito e uma das suas aplicações é permitir identificar anemias microcíticas, como por exemplo a anemia por deficiência de ferro ou Talassemias pois o VCM nestas situações possui valores baixos. No caso de

anemias macrocíticas encontra-se aumentado, como por exemplo na anemia megaloblástica. [13]

Nas anemias auto-imunes devido à existência de auto-anticorpos frios, o VCM está falsamente elevado, pois os anticorpos existentes provocam aglutinação dos eritrócitos. [17]

O RDW corresponde ao coeficiente de variação da curva, ou seja, é a distribuição do volume das células.

Este parâmetro pode auxiliar no diagnóstico de anemias e geralmente indica microesferócitos. Quando o RDW possui um intervalo de valores muito alargado, diz-se que existe anisocitose, ou seja, a anisocitose consiste no aumento da variação do tamanho dos eritrócitos relativamente ao normal.

Para além destes parâmetros que o autoanalisador obtém de forma direta, existem outros que são calculados: Hematócrito (HT), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM);

O HT corresponde à razão entre o volume de eritrócitos e o volume de sangue total sendo o resultado expresso em percentagem. [13] É calculado segundo a fórmula:

$$HT = VCM \times RBC \times 10 \quad [16]$$

A HCM (pg) reflete o conteúdo médio de hemoglobina por eritrócito, permitindo definir as anemias como hipocrómicas ou normocrómicas. E é calculada a partir de: [13]

$$HCM = (Hb/RBC) \times 100 \quad [16]$$

Uma das situações em que se encontra diminuída é na anemia por défice de ferro. [13]

A CHCM (g/dL) avalia o grau de saturação da hemoglobina no eritrócito e é calculada a partir de:

$$CHCM = (Hb / HT) \times 10 \quad [16]$$

Existem outros parâmetros que ajudam a classificar as anemias que não são determinados no sector de hematologia, como é o caso da ferritina, transferrina e a capacidade de fixação do ferro (TIBC). [13]

Geralmente os eritrócitos apresentam uma coloração homogénea, mas por vezes estes apresentam inclusões.

Durante o estágio foi possível observar dois exemplos dessas inclusões. Os corpos de Howell-Jolly (figura 8) e o ponteados basófilo (figura 9).

Os corpos de Howell-Jolly correspondem a fragmentos que derivam do DNA e são comuns em anemias hemolíticas, megaloblásticas e em doentes que foram submetidos a uma esplenectomia. O ponteados basófilo resulta da degradação do RNA e é comum em anemias hipocrômicas. [18]

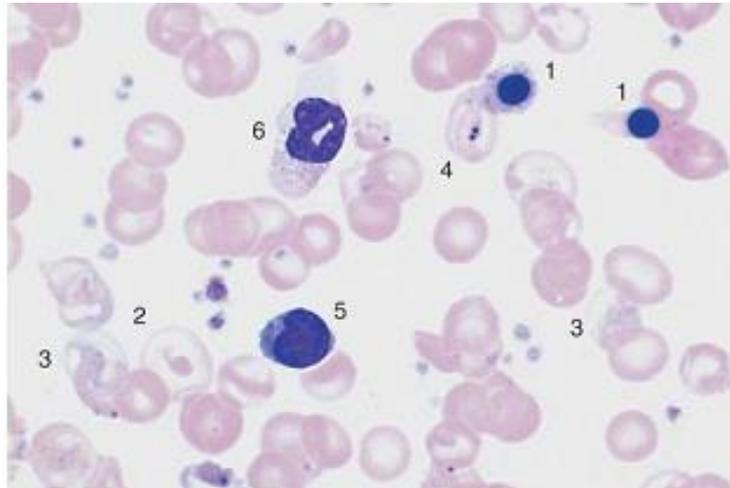


Figura 8. Esfregaço sanguíneo de uma Talassemia Major onde é possível observar eritrócitos com corpos de Howell-Jolly (Fonte: [13])

Outra alteração morfológica comum nos eritrócitos é o aparecimento de células em alvo (figura 8) cujo aparecimento é comum em situações de Talassemias e anemias por deficiência de ferro. [13]

Relativamente à alteração da contagem de reticulócitos, uma vez que estes são células imaturas da linha eritroide, encontram-se aumentados em casos de anemias hemolíticas.

Pelo contrário, quando há uma supressão da medula óssea, a contagem de reticulócitos está diminuída. [13;18]

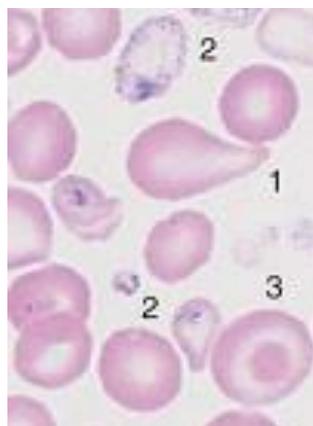


Figura 9. Esfregaço sanguíneo de uma Talassemia Minor onde é possível observar eritrócitos com o ponteados basófilo (2) e células em alvo(3) (Fonte: [13])

ii) Contagem diferencial de leucócitos

O Hemograma permite-nos fazer uma avaliação quantitativa dos leucócitos e elucidá-los sobre variadas situações. De seguida, descrevo algumas das situações que surgem no laboratório:

- Neutropenia corresponde à diminuição de neutrófilos para valores inferiores a $1.5 \times 10^9/L$ e é comum ocorrer em situações como infeção por vírus (EBV, Hepatites), intoxicação por drogas, doenças auto-imunes (Lúpus Eritematoso), Leucemias Agudas e Síndromes Mielodisplásicas (SMD) e quimioterapia.

- A neutrofilia é considerada o aumento de neutrófilos. Ocorre em situações de infeção bacteriana, gravidez, terapêutica com corticosteróides, etc.

- A linfocitose refere-se ao aumento de linfócitos. É frequente em infeções virais como o sarampo e a varicela para além de situações como a tosse convulsa e a brucelose. Patologias linfoproliferativas como é o caso da Leucemia Linfocítica Crónica também apresentam este quadro clínico.

A Mononucleose infecciosa é das patologias infecciosas em que a linfocitose é mais evidente.

- A monocitose corresponde ao aumento de monócitos. Pode ser devido a infeções provocadas por bactérias e micobactérias (tuberculose) ou pelo *Plasmodium falciparum*. É comum em doenças auto-imunes e neoplasias como por exemplo na Leucemia Mielomonocítica Aguda.

- A eosinofilia reflete o aumento do número de eosinófilos, superior a $400 \mu L$ e normalmente está associada a infeções provocadas por parasitas. Também é comum em doentes que se encontram a fazer radioterapia.

- A basofilia corresponde ao aumento de basófilos para valores superiores a $150 \mu L$. Geralmente acompanha o aumento dos eosinófilos, estando também associada a infeções por parasitas, reações alérgicas a alimentos e a medicamentos. [13]

Além das alterações quantitativas, pode ocorrer alterações da morfologia dos neutrófilos:

- Granulação tóxica: corresponde ao aparecimento de uma granulação basófila no citoplasma. Normalmente está associado a infeções severas ou a situações de intoxicação.

- Presença de vacúolos no citoplasma: são observados em situações de infeções severas e/ou situações de intoxicação.

- Neutrófilos hiperlobulados (figura 10): neutrófilos que possuem mais de 5 lóbulos. Geralmente o aparecimento da hipersegmentação está associada a anemia megaloblástica, infecções bacterianas ou transtornos metabólicos por intoxicação. [14]

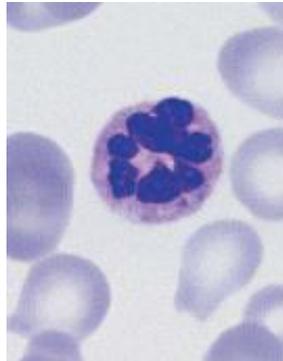


Figura 10. Neutrófilo hiperlobulado (Fonte: [13])

iii) Estudo de plaquetas

Relativamente ao estudo das plaquetas, podem aparecer casos de trombocitopenia que corresponde a uma diminuição do número de plaquetas e de trombocitose que indica aumento do número das mesmas. [13]

A trombocitopenia pode ter várias causas como por exemplo a terapêutica com heparina. Uma das patologias mais comuns é a trombocitopenia idiopática.

Nestas situações é normal encontrar um aumento do número de megacariócitos na medula.

Por vezes a trombocitopenia deve-se à redução da produção de plaquetas, como é o caso do alcoolismo crónico, infeções virais (EBV), neoplasias e deficiência em vitaminas.

A trombocitose pode aparecer em resposta a diversos tipos de tumores, situações de inflamação crónica e deficiência de ferro. [13]

A Trombocitemia Essencial é um síndrome mieloproliferativo caracterizado por um aumento do número das plaquetas superior a $600 \times 10^9/L$. A Policitemia Vera e a Leucemia Mielóide Crónica são outras patologias em que se observa trombocitose. [13]

ESFREGAÇO DE SANGUE PERIFÉRICO

Quando nos hemogramas:

- as células sanguíneas ou os parâmetros característicos delas apresentam valores fora do comum;
- o instrumento não determinou a fórmula leucocitária;

- o instrumento indica a existência de células imaturas, agregados plaquetares ou plaquetas gigantes,

é necessário realizar um esfregaço sanguíneo que é posteriormente corado pela coloração de Wright-Giemsa e é observado ao microscópico para avaliar a existência ou não de células patológicas e de alterações morfológicas. O esfregaço sanguíneo deve ser efetuado de acordo com as instruções ilustradas na figura 11.

A coloração de Wright-Giemsa utiliza uma mistura de corantes: um corante básico e um corante ácido que coram substâncias complementares, ou seja, substâncias ácidas e básicas respectivamente. [13] Estruturas como os ácidos nucleicos, basófilos fixam corante básico apresentando uma coloração azulada. Já os eosinófilos e os eritrócitos apresentam uma coloração mais clara pois fixam a eosina (corante ácido).

No sector de hematologia do IPO de Coimbra esta coloração é realizada no *Aerospray® 7150 Hamtology Slide Stainer Cyto centrifuge* da WESCOR®. A observação ao microscópico deve ser efetuada primeiramente recorrendo à ampliação de 10x para observar o aspecto geral do esfregaço sanguíneo e de seguida com a ampliação de 50x de imersão na zona menos densa do esfregaço com o intuito de realizar a contagem diferencial de leucócitos, observar alterações morfológicas dos leucócitos, eritrócitos e das plaquetas, bem como a presença de agregados plaquetários. Deve ainda ter-se em atenção a presença de células precursoras das diferentes linhagens.

Anemias, leucemias, linfomas podem ser diferenciados e avaliados a partir desta observação.

[13]

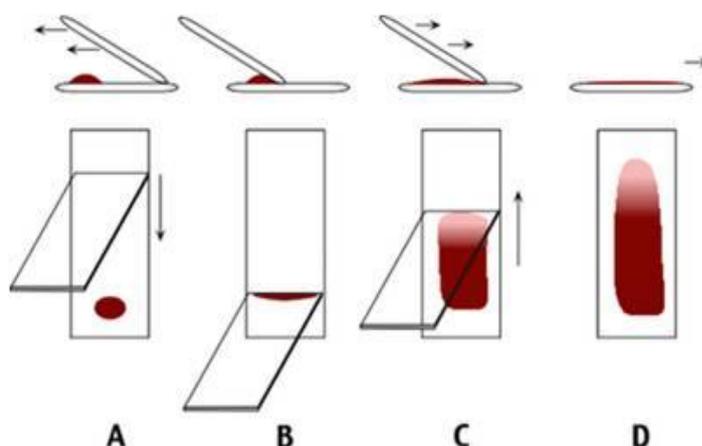


Figura 11. Representação de como é que deve ser feito um esfregaço de sangue periférico
(Fonte: <http://hemo-citologia.blogspot.pt/>)

VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO

A velocidade de sedimentação é um exame inespecífico pedido com alguma frequência que permite detetar situações de doença ativa. Consiste na avaliação da sedimentação dos eritrócitos e é realizado de modo automático no *Test 1 BCL* da *ALI FAX®*. Neste sistema ocorre primeiramente uma homogeneização das amostras que dura cerca de 2 minutos, e os resultados são obtidos num intervalo de 20 segundos entre as amostras.

O método de referência para a determinação deste parâmetro é o de Westergren. Segundo este método coloca-se a amostra numa pipeta graduada (de 0 a 200 mm) que está disposta verticalmente sobre a bancada de trabalho e o resultado é obtido pela medição da distância em milímetros da localização dos eritrócitos sedimentados após uma hora. Assim, os valores são dados em mm/hora.

No *Test 1 BCL* da *ALI FAX®* a determinação da VS segue o princípio de fotometria capilar de fluxo (análise cinética).

A velocidade de sedimentação é influenciada por proteínas de fase aguda como o fibrinogénio e as imunoglobulinas e também pela forma dos eritrócitos. Geralmente encontra-se aumentada em situações de infeção, inflamação e nos Mielomas Múltiplos por aumento das proteínas e pode estar diminuída em casos de doença hepática, carcinomas por incapacidade de produzir estas mesmas proteínas. [13]

MEDULOGRAMA

A medula óssea é o principal órgão hematopoiético e também é considerado um tecido linfóide primário. A sua grande importância advém da capacidade de produzir eritrócitos, granulócitos, monócitos, linfócitos e plaquetas. [19]

Por vezes não é possível garantir o diagnóstico apenas com a observação do esfregaço de sangue periférico. Nestas situações é recomendado a realização de um esfregaço a partir do aspirado medular.

A amostra deve ser colocada num tubo com EDTA e é corada pela mesma técnica que o sangue periférico, Wright-Giemsa no equipamento anteriormente referido. A observação do esfregaço de medula deve começar pela procura de fragmentos ósseos com a ampliação de 10x e posteriormente de megacariócitos. A observação propriamente dita deve ser realizada com as ampliações de 50x e/ou 100x. [13;18]

Para além do esfregaço para a coloração de Wright-Giemsa (figura 12) é realizado outro para ser corado pela coloração de Perls. A utilização de ferrocianeto ácido nesta

coloração permite identificar depósitos de ferritina em 20-40% dos normoblastos, passando a designarem-se sideroblastos. Em situações como a anemia sideroblástica, os depósitos de ferritina formam um anel, originando sideroblastos em anel.

Com esta coloração também é possível observar depósitos de ferro em macrófagos. [13] A coloração de Perls encontra-se ilustrada na figura 13.

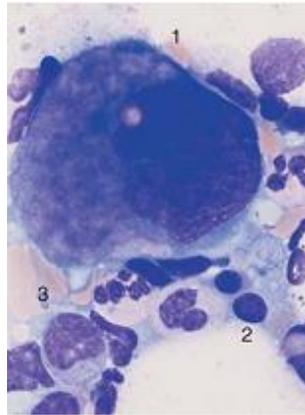


Figura 12. Medula óssea normal corada por Wright-Giemsa: megacariócito (1), eritroblasto (2) e mielócito(3) (Fonte:[13])

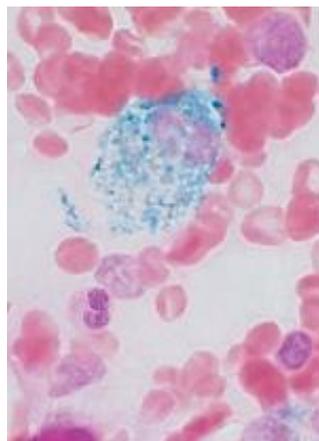


Figura 13. Medula óssea corada pela coloração de Perls (Fonte: [13])

HEMOSTASE

As amostras utilizadas para o estudo da hemostase devem ser colhidas para um tubo com citrato trisódico na proporção de 1:9. Este anticoagulante é um quelante de Ca^{2+} . É muito importante a presença deste anticoagulante uma vez que o Ca^{2+} catalisa a conversão de protrombina em trombina. Antes da realização dos testes a amostra deve ser centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos para se obter o plasma. [14]

O estudo da hemostase é efetuado no *ACL TOP® CTS 500* da Instrumentation Laboratory, que de modo geral, realiza os testes de coagulação medindo o tempo decorrido entre a adição do reagente do teste e a formação de fibrina.

Na figura 14 está representado esquematicamente a cascata de coagulação, estando indicadas as diferentes vias: a via extrínseca, a via intrínseca e a via comum.

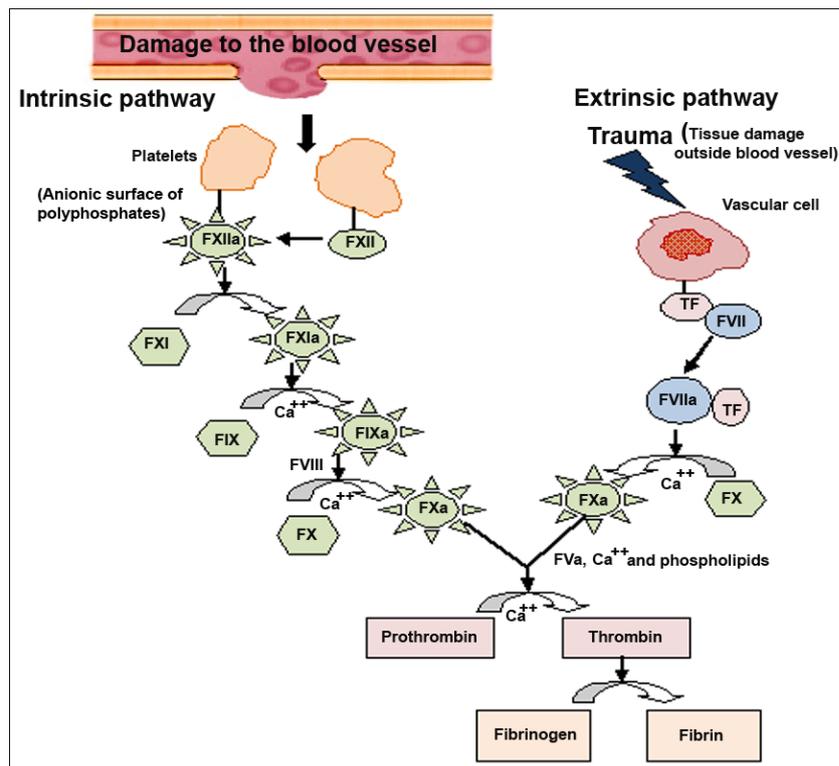


Figura 14. Representação esquemática da cascata de coagulação in vitro. (Fonte : <http://www.squ.edu.om/portals/108/Hematology/hemostasis.jpg>)

• Determinação do Tempo de Protrombina

O Tempo de Protrombina (TP) é utilizado para avaliar a via extrínseca e a via comum da cascata de coagulação. Quando se encontra prolongado pode indicar o déficit dos fatores destas vias (II, VII,X). [14]

O TP permite ainda monitorizar doentes que realizam terapêutica anticoagulante (antagonistas da Vitamina K).

Foi criado o INR que corresponde a uma normalização internacional do tempo de protrombina que permite a correlação interlaboratorial dos TP e um melhor controlo da terapêutica anticoagulante. É obtido pela seguinte fórmula: [14;18]

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{PT Doente}}{\text{PT Normal}} \right)^{\text{MSE}}$$

O TP do plasma normal é obtido através da média aritmética da determinação de 20 plasmas normais.

O resultado de um teste de TP é fornecido sob três formas: em segundos; em percentagem de atividade ou protrombinémia; e segundo o INR .

• **Determinação do Tempo de Trombina**

A determinação do Tempo de Trombina (TT) permite avaliar a fase final da coagulação. A determinação quantitativa do TT baseia-se na conversão do fibrinogénio presente na amostra em fibrina pela adição da trombina e é medido o tempo que decorre até à formação do coágulo. É usualmente pedido para auxiliar no diagnóstico da Coagulação Intravascular Disseminada (DIC) e para monitorizar a terapêutica com anticoagulante (heparina).

Algumas das situações em que se encontra prolongado é na presença de inibidores da trombina (terapêutica com heparina), hipofibrinogénia e quando há aumentos dos produtos de degradação da fibrina. [14;18]

• **Determinação do Tempo de Tromboplastina Parcial activada**

O Tempo de Tromboplastina Parcial activada (aPTT) é um parâmetro que permite avaliar a fase intrínseca da cascata de coagulação. Para o cálculo deste parâmetro é necessário adicionar ao plasma um ativador de superfície fosfolípidos, e cálcio que vão ativar a cascata e permitir a formação do coágulo.

O aPTT encontra-se alargado em algumas situações em que há défice de fatores da coagulação (VIII, X), doenças hepáticas, défice de vitamina K, défice de fibrinogénio e em situações em que o doente se encontra a fazer terapêutica com heparina. [14;18]

Em situações em que o aPTT e o TP se encontram prolongados deve repetir-se a determinação diluindo o plasma do doente com plasma normal. Caso os tempos sejam corrigidos para valores normais é indicativo que o prolongamento se devia a um défice de fatores de coagulação. Situações como as Hemofilias em que há um défice do Fator VIII e do Fator IX (Hemofilia A e Hemofilia B respectivamente) e no caso da Doença de VonWillebrand verifica-se esta correcção.

Caso não haja correcção, a suspeita recai sobre a presença de um inibidor da coagulação (por exemplo, o Inibidor Lúpico). [18]

• **Determinação do Fator VIII**

O Fator VIII é uma glicoproteína plasmática sintetizada no fígado que é transportado no plasma ligado ao Fator de VonWillebrand. É um cofator da coagulação ativado pela trombina ou pelo Fator Xa, sendo essencial para a ativação do Fator IX que por sua vez leva à ativação do Fator X. [18]

A sua determinação é realizada tendo por base um tempo de tromboplastina parcialmente ativado aumentado.

O défice do Fator VIII está associado à Hemofilia A, a doença hereditária mais comum do foro das patologias associadas à coagulação. [18]

Pode ainda estar diminuído em outras patologias como é o caso da Doença de VonWillebrand, doenças hepáticas ou na DIC.

• **Determinação da proteína C**

A proteína C é um anticoagulante natural e tem atividade profibrinolítica. É ativada após formação da trombina e ligação desta ao recetor endotelial, trombosmodulina. É dependente da vitamina K e é ativada por outra proteína também dependente da vitamina K, a proteína S. A sua função consiste em degradar o Fator Va e o FatorVIIIa, inibindo a coagulação, por um lado, e por outro aumenta a fibrinólise uma vez que impede a ação do inibidor do ativador do plasminogénio tecidual. [18]

O défice de proteína C aumenta o risco de trombose venosa e pode estar associado a hepatopatias, terapêuticas anticoagulantes, trombofilia familiar e DIC.[20]

A sua quantificação baseia-se num teste cromogénico.

• **Determinação da proteína S Livre**

A forma livre da Proteína S é a que tem atividade biológica, agindo como uma coenzima essencial para a ativação da proteína C, aumentando os seus efeitos anti-coagulantes e profibrinolíticos. Também esta proteína é dependente da Vitamina K.

O seu défice está associado a um maior risco de tromboembolismo venoso.

É determinada por turbidimetria a partir da reação de aglutinação com um anticorpo monoclonal que reveste uma partícula de látex. O grau de aglutinação é proporcional à concentração da proteína S livre presente no plasma.

• **Deteção do Anticoagulante Lúpico**

O anticoagulante lúpico (AL) é um auto- anticorpo que se liga aos fosfolípidos da membrana com carga negativa e a fatores de coagulação como a protrombina.

O AL pode ser encontrado no plasma de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistémico. Esta patologia é caracterizada pelo aumento do aPTT que não corrige após mistura com plasma normal.

Paradoxalmente está associado ao risco de trombose arterial e venosa uma vez que impede a ação dos inibidores naturais e à interrupção prematura da gravidez.

As amostras para a deteção do AL requerem um processamento especializado. Estas amostras sofrem duas centrifugações a 2500 x g durante 15 minutos para garantir que não há contaminação plaquetar.

A sua deteção no *ACL TOP® CTS 500*, é realizada tendo por base o método de veneno diluído de víbora Russel. São utilizados paralelamente dois ensaios: um de screening (HemosIL dRVVT Screen) e outro de confirmação (HemosIL dRVVT Confirm). O ensaio HemosIL dRVVT Screen é pobre em fosfolípidos, tornando-se sensível ao AL enquanto que o HemosIL dRVVT Confirm tem a capacidade de neutralizar o AL conferindo, tempos de coagulação normalizados. Nestes ensaios a cascata de coagulação é iniciada pela adição do veneno de víbora de Russel que na presença de cálcio ativa o Fator X.

• **Quantificação do Fibrinogénio**

O fibrinogénio é uma glicoproteína de fase aguda positiva sintetizada no fígado que tem uma ação muito importante na hemostase, na inflamação e na angiogénese. Estes processos envolvem a conversão de fibrinógeno em fibrina por ação da trombina. [21]

O doseamento do fibrinogénio é feito pelo Método Clauss, onde é utilizado um excesso de trombina para converter o fibrinogénio em fibrina no plasma diluído. Quando as condições de ensaio são caracterizadas por uma elevada concentração de trombina e uma baixa concentração de fibrinogénio, a velocidade de reação depende da concentração de fibrinogénio.

O seu doseamento permite avaliar situações de doenças hepáticas, quadros inflamatórios e patologias relacionadas com o processo de coagulação, como por exemplo a DIC. [22]

O seu aumento está associado a um maior risco de doenças cardiovasculares. [23]

• Quantificação dos D-Dímeros

Após a degradação da fibrina por ação da plasmina há formação de fragmentos proteicos que incluem os D-Dímeros.

Estes são doseados por turbidimetria após imunoensaio.

A sua determinação auxilia no diagnóstico de risco de trombose e na monitorização de terapêuticas trombóticas.

Este parâmetro pode aparecer elevado em situações de isquémia, gravidez, DIC e em casos de existência de tumores. [23]

Na tabela 3 estão representadas as alterações mais comuns relativamente à hemostase.

Tabela 3. Alterações dos parâmetros da hemostase nas condições clínicas mais vulgares. [12]

	Contagem das plaquetas	PT	aPPT	TT
Patologias hepáticas	Baixo	Prolongado	Prolongado	Normal (raramente prolongado)
DIC	Baixo	Prolongado	Prolongado	Muito prolongado
Transfusões massivas	Baixo	Prolongado	Prolongado	Normal
Heparina	Normal (raramente baixo)	Prolongado	Prolongado	Prolongado
Anticoagulante em circulação	Normal	Normal ou prolongado	Prolongado	Normal

CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é uma técnica que permite fazer uma análise quantitativa e ainda possibilita a diferenciação e classificação de células que se encontram na suspensão.

Nos últimos anos a sua utilização no laboratório tem crescido, provavelmente devido ao facto de ser de fácil manuseamento, rápida e ter uma grande aplicação na clínica.

Os resultados são obtidos a partir da análise das propriedades óticas (dispersão de luz e fluorescência). A dispersão de luz vai depender do tamanho e da complexidade celular. Por sua vez a fluorescência resulta dos diferentes fluorocromos utilizados que possibilitam a análise simultânea de diferentes antígenos celulares (de superfície ou intracelulares). [24]

No SPC a citometria de fluxo é realizada no *Cytomicsfc 500 Beckman Coulter* que possui 5 tubos fotomultiplicadores: um para a dispersão lateral e quatro para as fluorescências.

A Imunofenotipagem permiti distinguir as patologias da linha mielóide das da linha linfóide devido à utilização de antígenos celulares específicos de cada linha.

Outra aplicação muito útil da citometria de fluxo é permitir avaliar a monitorização e a resposta à terapêutica de doentes infectados com HIV.

Na tabela 4 estão representados alguns dos fenótipos mais comuns expressos por algumas doenças linfoproliferativas de células B.

Tabela 4. Fenótipos de células B comuns em doenças linfoproliferativas: +, positivo; -, negativo; +/-, positivo frequentemente; -/+,raramente positivo; w, weakexpression.(Fonte: adaptado [25])

	Leucemia Linfocítica Crónica	Linfomas de células de Malt	Linfoma Folicular	Linfoma da Zona Marginal	Leucemia das Células cabeludas
CD5	+	+	-	-	-
CD10	-	-	+	-	-
CD19	+	+	+	+	+
CD20	+	+	+	+	+
CD23	+	-	-/+	-	-
CD79b	-	+	+/-	+/-	+/-
CD25	-/+	-	-	-/+	+/-
CD11c	+/-	-	-	+	+
CD103	-	-	-	-	+

DETEÇÃO DO GENE BCR-ABL

A Leucemia Mielóide Crónica é caracterizada pela presença do cromossoma Philadelphia que resulta de uma translação recíproca entre os cromossomas 9 e 22: t(9;22) (q34;q11). Ocorre a translação do proto-oncogene ABL presente no cromossoma 9 para junto do gene BCR presente no cromossoma 22. O gene BCR-ABL codifica uma proteína que tem atividade de tirosina- cinase, ou seja, realiza a fosforilação de resíduos de tirosina levando à alteração da função das proteínas e perda da capacidade de regulação dos ciclos celulares. [9;25]

O estudo do gene BCR- ABL no SPC no IPO de Coimbra é realizado no GenXpert por real time – PCR utilizando como amostra sangue total colhido para tubo com EDTA.

TESTE DE GRAVIDEZ

É ainda no sector de hematologia que é realizado o teste rápido de gravidez. É utilizado o BETA Clear™ HCG, teste que compreende a deteção da HCG por um ensaio imunocromatográfico. Para a realização deste teste é utilizado como amostra urina.

A HCG é uma glicoproteína sintetizada pelas células da placenta a partir do 8º dia da gravidez atingindo um pico máximo de concentração entre as 10 e as 12 semanas de gestação. [26]

CONTROLO QUIMICO DE QUALIDADE

O controlo de qualidade interno do Hemograma é realizado diariamente utilizando três níveis de controlo: um para os parâmetros normais, outro para os parâmetros elevados e outro para os parâmetros reduzidos.

O controlo interno dos reticulócitos só é efetuado quando surge um pedido para contagem automática dos mesmos. Neste caso também são utilizados os três níveis.

Os parâmetros relacionados com a hemostase também são controlados diariamente utilizando dois níveis: um de valores normais e outro com valores baixos ou altos (alterna semanalmente). Os D-dimeros são a única exceção uma vez que são sempre controlados com um nível alto e um nível baixo.

O controlo de qualidade externo segue as normas do RIQAS (*Randox international quality assesement scheme*) e do INSA. Na tabela 5 estão representados os institutos, a periodicidade e que parâmetros é que são avaliados no respetivo controlo.

O controlo de qualidade externo da Citometria de Fluxo segue as normas do UK-NEQAS, recebendo por isso 6 amostras por ano relativas a patologias hematológicas.

É ainda realizado um controlo semanalmente do princípio VCS, o Latron. Este controlo tem como objetivo garantir que atubagem do equipamento está a funcionar correctamente e que não há erros na medição do VCS.

Tabela 5. Representação esquemática do CQE do sector de Hematologia

Instituto	Parâmetros	Periodicidade	
RIQAS	RBC	1 amostra/ mês durante 12 meses	
	Hb		
	HT		
	VCM		
	MCHC		
	HCM		
	WBC		
	PLT		
			1 amostra/ mês durante 12 meses
	TP (INR %)		
	PTT		
	TT		
	Fibrinogénio		
	Factor VIII		
AT			
Proteína – C			
Proteína –S livre			

Tabela 5. Continuação

		RBC		
INSA	HEMOGRAMA	Hb		
		HT		
		VCM	4 amostras/ano	
		MCHC		
		HCM		
		WBC		
			PLT	
			TP	
	HEMOSTASE	aPTT	4 amostras/ano	
		TT		
Fibrinogénio				
Reticulócitos	Valores absolutos			
(método automático)	Valores relativos (%)	2 amostras/ ano		
Morfologia do sangue periférico	Observação de esfregaços em lâminas	3 Esfregaços por controlo 3 Controlos por ano		

2.3. Sectores de Imunologia, Serologia e Hormonologia

Nestes Sectores efetuam-se a determinação de hormonas, outros marcadores tumorais, marcadores cardíacos, drogas terapêuticas, proteínas de fase aguda e o estudo serológico de alguns agentes infecciosos como *Virus de Epstein-Barr (EBV)*, *Virus da Rubéola* e o *Toxoplasma gondii*.

É também nestes Sectores que se realizam as técnicas electroforéticas de proteínas (proteinograma), hemoglobina, isoenzimas da LDH e Fosfatase alcalina, bem como a imunofixação do soro e da urina de 24 horas (Proteinúria de Bence Jones).

A maioria das determinações é efetuada no soro que se obtém a partir da centrifugação (10 minutos à temperatura de 15°C)¹ do sangue total que esteve previamente em repouso durante cerca de 15 a 20 minutos até à retração do coágulo. O sangue após ser colhido é dispensado para tubos que contêm esferas indutoras da coagulação que criam uma barreira física após centrifugação. O soro é então o resultado da centrifugação do sangue total sem os fatores de coagulação, como a fibrina. Efetuam-se também determinações em plasma (Renina, ACTH, Metanefrinas fraccionadas), em sangue total (tubos com EDTA) para a realização da electroforese da hemoglobina e ainda em saliva para a determinação do cortisol salivar.

Na tabela seguinte (6) estão representados os equipamentos que existem neste sector, bem como o princípio da técnica utilizada pelos mesmos e os analitos que são determinados nos respetivos equipamentos.

¹Amostras que são colhidas para a determinação de ACTH e Metanefrinas plasmáticas (determinadas no plasma) têm que ser armazenadas e centrifugadas a frio, 4 a 8°C, por serem termolábeis.

Tabela 6. Equipamento e princípio utilizado pelo mesmo na determinação dos analitos

Equipamento	Técnica	Analitos
<i>Cobas e601 Analyser</i> ® da Roche™	Electro-quimioluminescência	Ácido fólico, CA 125, CA 19.9, CA 72.4, Cyfra 21.1, Cortisol, Cortisol salivar, Cortisol urinário ² , FT3, FT4, HE-4, Insulina, Osteocalcina, IL6, Peptideo C, NT Pró-BNP, T3, T4, Testosterona total, Trab's, Vit. B12, 25-OH Vit.D total;
<i>Liaison</i> ® da DiaSorin™	Quimioluminescência luminométrica	CKMB massa, Mioglobina, Troponina I, TPS, Renina, EBV, Rubeóla, <i>Toxoplasma gondii</i> , SI00, BAP;
<i>Centaur</i> ® da Siemens	Quimioluminescência	DHEA-SO4, Estradiol, FSH, Ferritina, iPTH, LH, Progesterona:
<i>Kryptor</i> ® da Brahms™	Fluorescência por <i>Time-Resolved Amplified Cryptate Emission</i>	CA 15.3, CgA, NSE, PCT, PROL (monomérica), SCC;
<i>Immolute 2000</i> ® XPi da Siemens™	Quimioluminescência	AF, ATG, ACTH, CAL, CEA, TPO, β-HCG, Δ4-Androstenediona, EPN, IgE total, IGF1, FPSA, PRL, TG, TPSA e TSH;
<i>Immolute 2000</i> ® da Siemens™	Quimioluminescência	β2-Microglobulina, GAS, GH, sHBG;

Tabela 6. Continuação

<i>BN-pró Spec</i> ® da Siemens™	Nefelometria	α1- Antitripsina Cadeias leves K/L, Factores do Complemento C3 e C4, Haptoglobina, Imunoglobulinas (IgG, IgA e IgM), PCR ultra sensível, Factor reumatóide, TASO, Transferrina, Ceruloplasmina;
<i>VIVA-E</i> ® da Siemens™	Imunoquímica (Ensaio imunoenzimático)	Ac.Valpróico, Carbamazepina, Digoxina, Fenobarbital, Fenitoína, Metotrexato;
<i>ImmunoCap</i> ® da ThermoScientific™	Imunoquímica (Ensaio imunoenzimático de fluorescência)	dsDNA, CTD, MPO, PR3, CCP, β-glicoproteína (IgG e IgM), anticorpos anti-cardiolipina (IgG e IgM);
<i>Hydrasis</i> ® da Sebia™	Eletroforese em gel de agarose e imunofixação	Electroforese de Hemoglobina, Imunofixação do soro, Pesquisa de proteína de Bence-Jones;
<i>LKB Wallac 1272 CliniGammaCounter</i>	Radioisótopos contagem com radiação gama	Técnicas manuais com radioisótopos: TGL, MTP, NMP, Aldosterona;

²O cortisol livre urinário é determinado no equipamento após extração com solvente orgânico (diclorometano).

TÉCNICAS MANUAIS

Para além das técnicas automatizadas, efetuam-se técnicas manuais. Na tabela 7, estão representados o tipo de amostra, o analito e a técnica utilizada para a sua determinação.

As metanefrinas plasmáticas e urinárias, a testosterona livre, a estrona, a 17-OH-progesterona, a DHEA e a aldosterona são determinadas por técnicas manuais de radioimunoensaios (RIA), dividindo-se em dois grupos: as Técnicas não competitivas ou de *Sandwich*, onde o anticorpo secundário (anticorpo conjugado) também se liga ao antigénio; e as *Técnicas competitivas*, onde o anticorpo conjugado compete com o antigénio pela ligação ao anticorpo primário.

Tabela 7. Analitos determinados em amostras para além do soro por técnicas manuais

Amostra	Analito	Técnica
Soro	Aldosterona	RIA
	Testosterona livre	
	Estrona	
	17-OH-Progesterona	
	DHEA	
Plasma	Metanefrinas fraccionadas plasmáticas	RIA
Urina	Iodo	ELISA
Urina 24h	Metanefrinas urinárias ³	RIA
	Ácido vanilmandélico ³	Cromatografia de troca iónica
	5OH Indolacético ³	

³Os contentores para colheita da amostra têm que conter ácido clorídrico para evitar a degradação do metabolito a analisar.

2.4. Sector de Bioquímica

Também conhecido como o sector da Química Clínica, este sector realiza determinações de diversos parâmetros como iões, enzimas, metabolitos e outros.

Tem como amostra mais frequente o soro obtido após a centrifugação do sangue total colhido para tubo com ativador da coagulação a 3000 rpm durante 10 minutos. Mas também realiza determinações em urina, no LCR, no sangue total com EDTA para determinar a Hemoglobina Glicosilada e ainda em outros fluidos biológicos como o líquido ascítico e o líquido pleural.

A maioria das determinações bioquímicas é realizada no autoanalisador *Cobas® 6000* da Roche Diagnostics™.

Na tabela 8 estão representados os vários parâmetros determinados no equipamento referido anteriormente e o respectivo método utilizado.

DOSEAMENTO DO CÁLCIO IONIZADO

A determinação de cálcio ionizado é efectuada no *ABL 800 Flex®* da Radiometer™ seguindo o princípio da potenciometria indirecta, ou seja, é utilizado um eléctrodo selectivo de iões. Com base no valor de cálcio ionizado e no valor do pH determinados na amostra é depois calculado o valor de cálcio ionizado a pH 7,4 (pH fisiológico óptimo). Este valor será mais aproximado ao real valor de cálcio ionizado.

Esta determinação é realizada em sangue total com anticoagulante (heparina compensada).

GASOMETRIA

A gasometria é uma análise que requer um resultado urgente. A colheita da amostra é considerado um ato médico e deve ser efectuada de forma anaeróbia de modo a minimizar os erros pré-analíticos.

A gasometria corresponde a um conjunto de determinações que se realiza no sangue arterial ou venoso (mais raramente efectuada) com anticoagulante. Pode ainda ser realizada noutros líquidos biológicos como por exemplo, no líquido pleural. Nesta análise podem ser determinados vários parâmetros como por exemplo: o pH, a concentração de bicarbonato

(HCO₃), as pressões parciais de oxigénio e de dióxido de carbono, a saturação de oxigénio da hemoglobina, electrólitos e lactato. No sector de Bioquímica do IPO de Coimbra estas determinações são realizadas no analisador RapidLab® 1265 da Siemens™.

Tabela 8. Representação dos parâmetros determinados no Cobas® 6000 da Roche Diagnostic™ e os respectivos métodos.

Método	Parâmetro
Imunoensaio	Hemoglobina Glicosilada
Enzimático–colorimétrico	Fosfatase ácida, Albumina, Fosfatase Alcalina, Bilirrubina Total, Colesterol Total, Colesterol HDL, Colesterol LDL, GGT, Ácido úrico, Triglicerídeos, Amónia, Magnésio
Químico – colorimétrico	Ferro, Proteínas totais, Bilirrubina Directa
Fotométrico	Cálcio Total
Enzimático com deteção UV	Creatina-Cinase, Glucose, Ureia, AST, ALT, Fosfato(inorgânico), Amílase, Lactato desidrogenase
Colorimétrico Cinético	Creatinina
Potenciometriaindirecta: Eléctrodo selectivo de iões	Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻

TÉCNICAS MANUAIS

Com o aparecimento dos autoanalisadores este sector evoluiu no sentido das determinações serem todas efetuadas no equipamento. Mas é importante saber realizar técnicas manuais uma vez que desenvolve e aperfeiçoa as técnicas de quem as executa.

Na tabela 9 estão indicados os parâmetros, o tipo de amostra e o método que é utilizado para a sua determinação.

Tabela 9. Indicação dos parâmetros determinados por técnicas manuais, bem como o tipo de amostra e o método utilizado

Parâmetro	Amostra	Método
Colesterol HDL	SORO	Enzimático (colesterol esterase, colesterol oxidase, peroxidase) e precipitação prévia com polietilenoglicol - Colorimétrico
Colesterol LDL		Enzimático (colesterol esterase, colesterol oxidase, peroxidase) – Colorimétrico
Colesterol Total		Enzimático (colesterol esterase, colesterol oxidase) - Colorimétrico
Triglicerídeos		Enzimático (lipase/glicerol quinase sem correcção de glicerol livre)
TIBC		Determinação directa com Ferrozina – Colorimétrico
Ácido Úrico		Enzimático (Uricase, peroxidase) – Colorimétrico
Fósforo		Químico (Fosfomolibdato) – Colorimétrico
Ferro		Colorimétrico (meio ácido, redução com ascorbato a Fe ²⁺ e reação com ferrozine)
Cálcio		Químico (Azul Metiltimol) – Colorimétrico
Proteínas Totais		Biureto
Magnésio		Químico (azul de xilidilo) – Colorimétrico
Cobre		Químico – Colorimétrico
Hemoglobina Glicosilada		Sangue total

No caso dos parâmetros que são determinados por métodos colorimétricos, a leitura de absorvância é efetuada num espectrofotómetro, *Shimadzu Spectrophotometer UV-120-02*.

TESTE RPR

A sífilis é uma doença sexualmente transmissível provocada pelo *Treponema pallidum*. Realiza-se o teste RPR que consiste num teste não treponemico macroscópico de floculação como forma de triagem. O teste RPR utiliza o soro ou o plasma como amostras.

Este teste não treponemico baseia-se na detecção de anticorpos designados reaginas que surgem após infeção com *Treponema Pallidum* no soro do doente. Num teste positivo ocorre aglutinação entre o anticorpo do soro do doente e o antígeno adicionado.

Quando estes anticorpos são detectados no soro ou no plasma é diagnosticada suspeita de sífilis. Os testes serológicos são importantes no auxílio do diagnóstico clínico da sífilis.

PESQUISA DE *Brucella spp.*

Os organismos do género *Brucella spp.* são cocobacilos intracelulares que provocam a brucelose.

O diagnóstico é efetuado a partir de um teste de aglutinação que utiliza o soro como amostra. Neste teste são utilizadas microplacas com poços revestidos por imunoglobulinas anti-humanas que têm afinidade para os anticorpos totais para antigénios da *Brucella* ocorrendo ligação no caso dos testes positivos. A positividade do teste indica a presença de anticorpos anti-*Brucella* na amostra.

3. CONCLUSÃO

“Uma lição de sonho e tradição” é o que o fado enaltece sobre Coimbra. Sem dúvida, ter escolhido Coimbra como cidade adoptiva para me receber para viver a minha época universitária e ter preferido continuar por cá no 2º Ciclo foi o que me permitiu realizar este estágio, que foi uma lição de vida onde enriqueci os meus conhecimentos teóricos, práticos e até a nível pessoal.

Primeiramente devo referir que o plano curricular do Mestrado de Análises Clínicas dá-nos as bases suficientes para a realização do estágio. Uma vez que a minha formação base é Bioquímica, muitas questões relacionadas com a clínica não eram do meu conhecimento. Assim considero que foi fulcral a sabedoria que adquiri no Mestrado. Vejo o Mestrado como uma ferramenta essencial para ser uma boa profissional no ramo das Análises Clínicas.

Relativamente ao estágio realizado no Serviço de Patologia Clínica do IPO de Coimbra, foi uma experiência que me vai marcar para o meu futuro profissional e não só.

Tive a sorte de ser acolhida num serviço onde a formação é algo visto com valor, onde todos colaboram para que o conhecimento seja transmitido e que de facto o estágio seja algo que nos enriquece.

Apesar de ser um hospital oncológico, a rotina hospitalar é semelhante a qualquer outro laboratório clínico. O facto de ter tido a oportunidade de poder conhecer e estagiar nas quatro valências das análises clínicas foi outra vantagem deste estágio. Nas quatro áreas encontrei pessoas dispostas a perderem o seu tempo a explicar, ensinar e a transmitir conhecimento.

Sendo as análises clínicas uma área com um poder enorme, que muitas vezes funciona como a solução de um quebra-cabeças, é essencial que estas sejam realizadas sob as melhores condições para que o clínico saiba que pode confiar nos resultados que são dados e tomar a melhor decisão para o doente. São estes doentes que representam o rosto, a história, as memórias que estão por detrás de um tubo de hemograma, de uma zaragatoa e nunca podem ser esquecidos.

Depois de ter vivido esta experiência posso confirmar que o meu futuro profissional passa definitivamente pela vida num laboratório clínico. Espero poder honrar todo o apoio e conhecimento que adquiri nestes dois anos e contribuir para que os cuidados de saúde sejam cada vez mais, efetuados com rigor e que transmitam elevados níveis de confiança aos “clientes”, não só médicos como aos próprios doentes.

4. BIBLIOGRAFIA

- [1] <http://www.sponcologia.pt/wp-content/uploads/2012/04/Tribuna-da-Madeira-06-04-2012.pdf> (acedido a 18 de Abril de 2014)
- [2] FONSECA, A.B. et al. – *Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia*. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge/Programa Nacional de Controlo de Infeção, 2004.
- [3] FORBES, B., SAHM, D., WEISSFELD, A., *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 12TH Edition, 2007
- [4] BENNER, E., *Simple disposable method for quantitative cultures of urine*. *Application Microbiology*, 1970, vol.10, 409-412
- [5] KONEMAN, E. et al. – *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5TH Edition, 2006
- [6] FERREIRA, W.; SOUSA, J. *Microbiologia Volume II* Lisboa: Lidel, ed. , 2000
- [7] HEEJUNG, K., WAN, K., MYUNGSOOK, K., *Evaluation of a Rapid Membrane Enzyme Immunoassay for the Simultaneous Detection of Glutamate Dehydrogenase and Toxin for the Diagnosis of Clostridium difficile Infection*. *Ann Lab Med*, 2014, 34:235-239
- [8] TRINCI, A., GULL, K., *Effects of actidione griseofulvin and triphenyltin acetate on the Kinetics of Fungal Growth*, *Journal of General Microbiology*, 1970, 60:287-292
- [9] KLOSS, W., SCHLEIFER, K., *Simplified scheme for routine identification of human Staphylococcus species*. *Journal of Microbiology*, 1975, 1:82
- [10] KARABAY, O., EKERBICER, H., YILMAZ, F., *Efficacy oh throat gargling for detection of group A beta-hemolytic Streptococcus*. *Japanese journal of infections diseases*, 2005, 58: 39-40
- [11] PERRY, J., DAVIES, A, BUTTERWORTH, L., HOPLEY, A., NICHOLSON, A., GOULD, F., *Development and Evaluation of a Chromogenic Agar Medium for Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42: 4519-4523
- [12] PATERSON, D., BONOMO, R., *Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update*. *Clinical Microbiology Reviews*, 2005, 18:657-686
- [13] THELM, H., DIEM, H., HAFERLACH, T., *Color Atlas of Hematology Pratical Microscopic and Clinical Diagnosis*. 2th Edition, 2004
- [14] ZAMBRANO, M., CORTIJO, C., *Manual de Procedimientos de Laboratorio en Técnicas Básicas de Hematología*, Ministerio de Salud- Instituto Nacional de Salud, 2005

- [15] FERNANDEZ, T., DOMACK, L., MONTES, D., *Performance Evaluation of the Colter LH 750 Hematology Analyzer*. *Laboratory Hematology*, 2001, 7: 217-228
- [16] Coulter LH750 System Help. *Help Version Information 2D1.103272*. Copyright Beckman Coulter Inc., 2011
- [17] BURMESTE, G., PEZZUTTO, A., *Color Atlas of Immunology*. 1th Ed., 2003, Thieme Flexibook
- [18] HOFFBRAND, A.V.; MOSS, P.A.H. – *Essential Haematology*. 6th Ed., Wiley-Blackwell, 2011
- [19] TRAVLOS, G., *Normal Structure, Function, and Histology of the Bone Marrow*, *Toxicologic Pathology*, 2006, 34:548–565
- [20] GRIFFIN, J., EVATT, B., ZIMMERMAN, T., *Deficiency of Protein C in Congenital Thrombotic Disease*. *The Journal of Clinic Investigation*, 1981, 68:1370-3
- [21] MARGUERIE, G., PLOW, E., EDGINDTON, T., *Human platelets possess an inducible and saturable receptor specific for fibrinogen*. *The Journal of biological chemistry*, 1979, 254:5357-5363
- [22] KROBOT, K., HENSE, H., CREMER, P., EBERLE E., KEIL U., *Determinants of plasma fibrinogen: relation to body weight, waist-to-hip ratio, smoking, alcohol, age, and sex*. *Jornal of the American Heart Association - Arterioscler Thromb Vascular Biology*, 1992, 12:780-788
- [23] KWANGSOO, K., LEE, J., *Risk Factors and Biomarkers of Ischemic Stroke in Cancer Patients*. *Journal of Stroke*, 2014, 16:91-96
- [24] BROWN, M., WITTEWER, C., *Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology*. *Clinical Chemistry*, 2000, 46:8
- [25] MELO, J., GORDON, D., CROSS, N., *The ABL-BCR Fusion Gene Is Expressed in Chronic Myeloid Leukemia*. *The American Society of Hematology*, 1993, 81:158-165.
- [26] MOLINA, R., FILELLA, X., *Utilidad clínica de los marcadores tumorales [Estado actual y perspectivas de futuro III]*, Roche Diagnostics S.L., 2011

ANEXOS

Anexo I. Microbiologia

- Tabela de Murray e Washington

	Células epiteliais / pequena ampliação (10x)	Leucócitos / pequena ampliação (10x)
GRUPO 1	25	10
GRUPO 2	25	10-25
GRUPO 3	25	25
GRUPO 4	10-25	25
GRUPO 5	<10	25

São consideradas amostras com boa qualidade as que se inserem nos grupos 4 e 5.

- Coloração de Gram

1. Cobrir o esfregaço já fixado, com solução de violeta de genciana durante 1 minuto.
2. Lavar com soluto de Lugole deixar actuar durante 30 segundos.
3. Lavar com água corrente
4. Colocar gota-a-gota álcool-acetona até descorar
5. Lavar com água corrente
6. Cobrir a superfície Fucsina diluída e deixar actuar durante 30 segundos.
7. Lavar com água corrente e deixar secar
8. As bactérias Gram positivo e leveduras coram de roxo escuro e as Gram negativo de rosa

- Coloração de Kinyoun

1. Cobrir o esfregaço já fixado, com Carbofucsina durante 4 minuto
2. Lavar com água corrente
3. Adicionar o descorante ácido-álcool a 3% (solução de ácido clorídrico e etanol/metanol) durante 5 segundos
4. Lavar com água corrente
5. Cobrir a superfície com Verde brilhante durante 30 segundos.

6. Lavar com água corrente e deixar secar

7. As BAAR apresentam uma coloração avermelhada

- Lista de Discos de Antibióticos presentes no laboratório

Amoxicilina (25µg)	Ciprofloxacina (5µg)	Linezolid (10µg)
Amoxicilina-ácido clavulânico (30µg)	Clindamicina(2µg)	Meropenem (10µg)
Ampicilina –sulbactam (20µg)	Cloranfenicol (30µg)	Metronidazol (5µg)
Aztreonam (30 µg)	Colistina (25 µg)	Minociclina (30 µg)
Benzilpenicilina (1U)	Cotrimoxazol (25µg)	Netilmicina (10µg)
Cefazolina (30 µg)	Doxicilina (30 µg)	Piperacilina-tazobactam (36µg)
Cefepime (30 µg)	Eritromicina (15µg)	Teicoplanina (30µg)
Cefotaxima (5µg)	Ertapenem (10µg)	Tetraciclina (30µg)
Cefoxitina (30µg)	Fosfomicina (200 µg)	Tigeciclina (15 µg)
Cefradina (30 µg)	Gentamicina (10 e 30µg)	Vancomicina (30 µg)
Ceftazidima (10µg)	Imipenem (10µg)	
Ceftriaxone (30µg)	Levofloxacina(5µg)	

Anexo II. Hematologia

- Valores de referência dos parâmetros eritrocitários

Parâmetro	Valor de referência	Unidade
RBC	4,5 – 6,5	10 ⁶ /μL
Hb	13 – 18	g/dL
VCM	85 – 95	fL
RDW	11,5 – 14,5	%
HT	35 – 47	%
HCM	27 – 32	pg
CMHG	32 – 36	g/dL
Reticulócitos	0,5 – 1,5	%

- Valores de referência dos parâmetros leucocitários

	Parâmetro	Valor de referência absoluto (10 ³ /μL)	Valor de referência relativo (%)
Subpopulações	Leucócitos	4,0-11,0	100
	Neutrófilos	1.8-7.7	45-70
	Linfócitos	0.8-4.4	20-40
	Monócitos	0.1-1.1	3-10
	Eosinófilos	0-0.5	1-5
	Basófilos	0-0.2	0-2

- Valores de referência Plaquetares

	Valor de referência	Unidade
Plaquetas	150-450	G/L

- Coloração de Perls

1. Colocar os esfregaços fixados na solução de trabalho (solução de ferrocianeto de potássio e ácido clorídrico) durante 10 minutos
2. Lavar em água desionizada
3. Realizar uma contracoloração durante 5 minutos em solução de trabalho de pararrosanilina
4. Passar por água desionizada e deixar secar ao ar