



Ana Sílvia Pacheco Gonçalves

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Faculdade de Farmácia

Estágio realizado no Serviço de Patologia Clínica

Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil

Áreas: Hematologia e Microbiologia

De outubro de 2012 a junho de 2013

Orientador: Doutor Frederico Fernando Monteiro Marques Valido



“É uma lei da natureza humana realizar, ser um trabalhador ativo, deixar o mundo um pouco melhor que o encontrado. O homem foi feito para realizar. A maior satisfação da vida provém da realização. Quando faz qualquer coisa - para os outros ou para o seu próprio bem - é feliz e sente-se útil.

O desejo de realizar nasce connosco. Desejamos fazer qualquer coisa digna, chegar sempre mais além, atingir alguns dos nossos ideais. A pedra angular do sucesso e da realização é a vontade. A ambição é a força que nos empurra para a luta. No momento em que deixarmos o prazer ou as dificuldades neutralizarem esta força, no momento em que deixarmos de avançar, no momento em que essa ambição morre, é então que morremos também. O sucesso real foi planeado para ser atingido nos três planos do nosso ser - físico, mental e espiritual.”

Alfred Montapert

AGRADECIMENTOS

Ao Doutor Frederico Valido, Diretor do Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra, pela orientação, disponibilidade, incentivo, e bons conselhos que sempre se dispôs a dar.

À Professora Doutora Leonor Martins de Almeida, Professora Catedrática da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pelo apoio ao longo dos dois anos de mestrado e pela confiança em mim depositada.

À Professora Doutora Maria Céu Rodrigues Sousa, pela preciosa ajuda e apoio dado na correção e melhoramento deste relatório de estágio.

Aos meus pais e irmão, por todo o apoio e paciência, confiança e carinho, ajuda e disponibilidade; por acreditarem sempre em mim e estarem sempre presentes, o meu muito, muito obrigada.

Ao meu namorado Tiago, que esteve sempre do meu lado ao longo deste mestrado e estágio, com uma palavra de apoio e um ombro amigo; obrigada por acreditares em mim, pela paciência e pela ajuda dada neste relatório.

À minha colega de mestrado e de estágio Amélia, fiel companheira ao longo destes anos e em especial durante os meses de estágio que partilhámos. Foi bom ter-te por perto: contigo partilhei dúvidas, teorias, e conhecimentos, que sempre estiveste disponível para ouvir. Mais que uma colega, tornaste-te amiga. A ti, um muito obrigada.

A todo o pessoal do Serviço de Patologia Clínica do IPO de Coimbra, pelo enorme apoio, simpatia, e disponibilidade; por todos os ensinamentos, conselhos e respostas, dados sem qualquer reserva ao longo destes meses. Pela confiança que depositaram em mim e no meu trabalho, muito obrigada.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO.....	3
CAPÍTULO 3: O SETOR DE HEMATOLOGIA	8
PARTE I: HEMOGRAMA E VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO	8
Velocidade de sedimentação.....	8
Hemograma	9
Esfregaço de sangue periférico: coloração de Wright-Giemsa	14
PARTE II: HEMOSTASE.....	15
Tempo de protrombina.....	17
Tempo de tromboplastina parcial	18
Tempo de trombina	19
Fibrinogénio	19
D-dímeros	20
Anticoagulante lúpico.....	20
PARTE III: IMUNOFENOTIPAGEM.....	21
PARTE IV: PESQUISA DO GENE BCR-ABL	23
PARTE V: CONTROLO DE QUALIDADE.....	23
CAPÍTULO 4: O SETOR DE MICROBIOLOGIA.....	25
PARTE I: COLHEITA E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS.....	25
PARTE II: IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS	26
Exame direto a fresco	26
Exame direto com coloração: coloração de Gram	27
Exame direto com coloração: coloração de Ziehl-Neelsen.....	27
Provas clássicas	28
Outras provas	29
Métodos de identificação e testes de suscetibilidade automatizados.....	29

PARTE III: MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA	31
PARTE IV: PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	34
Urina	34
Expetoração	36
Sangue	39
Fezes	40
Exsudados purulentos	42
Exsudados vaginais	43
Catéteres centrais	44
LCR	45
PARTE V: IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS	46
PARTE VI: CONTROLO DE QUALIDADE	47
CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

LISTA DE ABREVIATURAS

AL: anticoagulante lúpico

BAAR: bacilos ácido-álcool resistentes

CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média

CTI: catéter totalmente implantado

DNA: ácido desoxirribonucleico

dRVVT: 'dilute Russel's viper venom time'

HCM: hemoglobina corpuscular média

Hct: hematócrito

Hgb: hemoglobina

HWHK: cininogénio de alto peso molecular

INR: 'international normalized ratio'

INSA: Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

IPO: Instituto Português de Oncologia

IPOCFG: Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil

LCR: líquido cefalorraquidiano

LJ: Löwenstein-Jensen

LLC: leucemia linfocítica crónica

LMC: leucemia mieloide crónica

LMMC: leucemia mielomonocítica crónica

NAD: dinucleótido de nicotinamida e adenina

PK: pré-caliceína

PNAEQ: programa nacional de avaliação externa da qualidade

PT: tempo de protrombina

PTT: tempo de tromboplastina

RBC: 'red blood cells'

RDW: 'red cell distribution width'

RIQAS: 'Randox international quality assessment scheme'

RT-PCR: 'reverse transcriptase–polymerase chain reaction'

SPC: Serviço de Patologia Clínica

TF: fator tecidual

TFPI: inibidor da via do fator tecidual

t-PA: 'tissue plasminogen activator'

TT: tempo de trombina

UFC: unidades formadoras de colónias

VCM: volume corpuscular médio

VCS: 'Volumes, conductivity, scatter'

VPM: volume plaquetar médio

RESUMO

Num laboratório de análises clínicas é possível, a partir de uma amostra clínica, obter valiosas informações que ajudam no diagnóstico, prognóstico, terapêutica, e prevenção da doença no paciente. As análises clínicas são um verdadeiro mundo, sendo hoje em dia possível realizar muitas análises diferentes, a partir de muitos tipos de amostra. O objetivo final é sempre ajudar o doente, e para isso é necessário compreender e conhecer os passos envolvidos na análise de uma amostra, bem como saber interpretar os respetivos resultados e participar ativamente no controlo de qualidade laboratorial.

O Serviço de Patologia Clínica (SPC) do Instituto Português de Oncologia (IPO) de Coimbra não foge a esta rotina, e foi o local aonde tive a oportunidade de desenvolver e consolidar conhecimentos na área das análises clínicas. No presente relatório dou a conhecer os diversos setores do SPC – Hematologia, Microbiologia, Química Clínica e Endocrinologia/Imunologia – e aprofundo posteriormente as atividades nas quais tive a oportunidade de participar nos setores de Microbiologia e de Hematologia. Também é descrito o processo de controlo da qualidade nestes setores, salientando a sua importância na validação de resultados no SPC do IPO de Coimbra.

ABSTRACT

In a clinical analyses laboratory it is possible to obtain valuable information from a clinical specimen that will help in the diagnosis, prognosis, therapy and prevention of disease in the patient. Clinical analyses are a world within itself and nowadays it is possible to perform many different analyses in many types of sample. The ultimate goal is to always help the patient, and it is crucial to fully understand the steps involved in the analysis of a sample, as well as to interpret the respective results and actively participate in quality control programs.

The Clinical Pathology of the Instituto Português de Oncologia (IPO) of Coimbra is no exception to this routine, and it was the place where I had the opportunity to develop and consolidate knowledge in the field of clinical analyses. In this report I will describe the different sectors of the Clinical Pathology – Hematology, Microbiology, Clinical Chemistry and Endocrinology/Immunology – and further explain the activities in which I had the opportunity to participate in the sectors of Microbiology and Hematology. Quality control in these sectors will also be described, stressing its importance in result validation in the Clinical Pathology of the IPO of Coimbra.

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO

O laboratório de análises clínicas pode definir-se como sendo o local onde, a partir de uma amostra clínica, se pretendem obter valiosas informações que ajudem ao diagnóstico, tratamento, e prevenção da doença no paciente analisado. Esta definição é talvez um pouco simplista, não traduzindo a verdadeira dimensão e importância do trabalho realizado num laboratório de análises. As análises clínicas são um mundo: desde a molécula de DNA à biopsia de um órgão, desde a amostra de sangue até ao tubo de líquido cefalorraquidiano, muitas são as amostras, análises, e resultados que diariamente se cruzam, com o objetivo último de ajudar o doente.

Não deixa de ser admirável o avanço da tecnologia ao longos dos tempos... a partir de uma ínfima quantidade de uma dada amostra, é possível chegar a um resultado, que muitas vezes determina o diagnóstico, prognóstico, e terapêutica de um paciente. Esta enorme responsabilidade é diariamente partilhada por todos aqueles que trabalham num laboratório de análises.

Tive o privilégio de, durante a duração deste estágio curricular, participar em todo este processo e sentir a responsabilidade subjacente ao trabalho feito na área das análises clínicas. O Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra foi o local onde me foi dada a oportunidade de aprender e participar na rotina de um laboratório de análises clínicas, nas quatro valências que o compreendem: Hematologia, Microbiologia, Química Clínica, e Endocrinologia/Imunologia. Pude assim tomar contacto com diferentes tipos de amostras, equipamentos, rotinas e metodologias, e não houve um único dia no qual não tivesse aprendido algo de novo.

Inicialmente, permaneci em cada valência durante quatro ou cinco semanas; após ter participado no trabalho realizado nos quatros setores referidos, escolhi então duas áreas para aprofundamento e discussão neste relatório: Microbiologia e Hematologia.

O setor de Microbiologia foi aquele onde iniciei o estágio, em outubro de 2012, e desde o primeiro dia não tive dúvida de que seria uma das minhas escolhas para este relatório. Com uma rotina, fluxo e tipo de amostras muito diferente de qualquer outro setor, é também aquele que mais depende do trabalho manual. O tempo despendido na análise cuidadosa de uma amostra e as decisões que têm de ser continuamente tomadas até se poder chegar a um resultado, bem como a beleza de uma coloração de Gram observada ao microscópio ou de diferentes colónias numa placa, foram pormenores que me fascinaram e interessaram desde o primeiro momento.

Já o setor de Hematologia revelou-me um mundo de células sanguíneas prontas a serem analisadas e observadas, bem como estudos de coagulação, e também a citometria de fluxo. Tive a oportunidade de visualizar amostras de sangue total e de medula óssea. As diferentes informações que se podem observar, discutir e comparar num hemograma, bem como a lógica envolvida na interpretação de resultados de estudos da coagulação e citometria, fizeram-me querer voltar a este setor para aprofundar tudo o que aprendi durante as primeiras cinco semanas em que ali estive.

Para além das valências já referidas, não poderia deixar de mencionar a oportunidade que me foi dada de, durante uma semana, fazer a ronda diária pelas diferentes enfermarias do IPOCFG, durante a qual os Técnicos de Análises Clínicas realizam a colheita de amostras aos doentes internados. Foi apenas uma semana, mas foi especialmente importante para mim ver os rostos por detrás dos tubos que diariamente chegam ao SPC. Esta breve experiência permitiu reforçar a ideia de que todo o trabalho das diferentes valências nas quais participei é feito em prol do doente; cada amostra ali recebida tem uma história, um rosto e um nome, e apesar das longas horas encerrados entre as quatro paredes do laboratório, não nos podemos esquecer nunca de que a qualidade do nosso trabalho é essencial a estes pacientes.

CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO

O Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil é uma unidade hospitalar que integra a rede de prestação de cuidados de saúde do Serviço Nacional de Saúde, tendo responsabilidades de topo no diagnóstico e tratamento da doença oncológica em toda a Região Centro, com uma população estimada de dois milhões e meio de habitantes.

O IPOCFG é uma instituição com mais de 50 anos de história. Em Coimbra, o Prof. Doutor Luís Raposo defendeu a criação de um centro anticanceroso capaz de dar resposta à população do Centro do País, o que veio a acontecer em 1953 com a aquisição de uma pequena vivenda – o primeiro edifício sede do Centro de Coimbra do IPO. Depois das obras de adaptação que se impunham, o Centro dá início à sua atividade em 1962 e, em 1977, autonomiza-se relativamente a Lisboa. Era o processo natural de emancipação de uma estrutura, cujo crescimento tornara imprescindível.

Da pequena vivenda adquirida em 1953, até aos nossos dias, decorreu mais de meio século. Demolindo velhas estruturas e remodelando outras, modernizando equipamentos e espaços, a instituição não tem parado de crescer, fiel ao seu mais nobre compromisso: a excelência de bem cuidar o doente oncológico.

Incluído nesta grande instituição está o Serviço de Patologia Clínica, dirigido pelo Doutor Frederico Fernando Monteiro Marques Valido, especialista em Patologia Clínica, apoiado por uma equipa de cerca de 30 elementos, constituída por médicos, farmacêuticos, bioquímicos, biólogos, técnicos de análises, administrativos e auxiliares. O SPC tem um fluxo diário de cerca de 300 utentes.

O SPC tem uma área administrativa, onde são recebidos os utentes e registados os pedidos de análises no sistema informático. A cada paciente é atribuído um número diário sequencial, seguido de uma letra, de A a G, consoante o dia da semana no qual as análises estão a ser realizadas. Este número é utilizado em todos os setores do serviço para gerar um código de barras, único para cada setor, e só depois de devidamente etiquetadas com este código é que as amostras são processadas.

Possui também uma área para a colheita de amostras, a partir de onde são distribuídas devidamente identificadas com o número do dia e respetivas requisições, sendo depois entregues no setor adequado. Também as amostras de internamento seguem este processo, pois são entregues em cada setor assim que chegam ao SPC.

Como já referido, o Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG engloba quatro valências, nomeadamente: Hematologia, Microbiologia, Química Clínica, e Endocrinologia/Imunologia. Cada um destes setores está equipado com diversas tecnologias e equipamentos.

I. Hematologia

O setor de Hematologia está sob a coordenação da Dr.^a Isabel Joana Diamantino, Assistente Hospitalar Graduada Especialista em Patologia Clínica.

Aqui são realizadas as diversas análises no campo da hematologia, incluindo: hemogramas, velocidade de sedimentação, observação de esfregaços de sangue periférico e de aspirados de medula óssea, estudos de hemostase e estudos de imunofenotipagem por citometria de fluxo, recorrendo a diversos equipamentos (Tabela I).

Tipo de amostras: sangue total, plasma, aspirados de medula óssea, líquidos orgânicos (tais como LCR).

Tabela I: Lista de equipamentos do setor de Hematologia no SPC do IPOCFG.

Equipamento e casa comercial	Especificações
<i>Beckman Coulter[®] LH750 Analyzer</i>	Hemogramas e contagem diferencial celular em sangue total (dois equipamentos)
<i>Test 1 Bcl da Alifax[®] SPA</i>	Velocidade de sedimentação [1 ^a hora] (dois equipamentos)
<i>Aerospray[®] 7150 Hematology Slide Stainer Cytocentrifuge da WESCOR[®]</i>	Coloração de esfregaços em lâmina
<i>ACL TOP[®] CTS 500 da Instrumentation Laboratory</i>	Estudos de hemostase (dois equipamentos)
<i>Beckman Coulter[®] Cytomics[™] FC 500 Beckman Coulter[®] TQ Prep[™] Workstation</i>	Estudos de imunofenotipagem por citometria de fluxo
<i>GeneXpert[®] da Cepheid</i>	Estudos genéticos por sistema integrado de reação de PCR em tempo real
Outros equipamentos: microscópio ótico.	

2. Microbiologia

O setor de Microbiologia está sob a responsabilidade da Dr.^a Paula Cristina Justino Gama, Assistente Hospitalar de Patologia Clínica.

Este setor processa tipos de amostras bastante diferentes dos recebidos nos outros setores, e é também o mais dependente do trabalho manual de técnicos especializados. São aqui realizadas análises bacteriológicas, micológicas e parasitológicas às amostras recebidas.

Possui também uma zona exclusivamente dedicada ao estudo bioquímico da urina (realização de sumárias de tipo II e observação do sedimento urinário). Apesar de este ser um estudo bioquímico, e não microbiológico, a realização deste tipo de análises à urina diretamente no setor de Microbiologia agiliza e facilita a interpretação de resultados das uroculturas.

Apesar de uma grande parte do trabalho ser feito manualmente (inoculação dos meios, homogeneização de amostras, interpretação de resultados, colorações de Gram e de Ziehl-Neelsen, entre outros), o setor de Microbiologia tem também diversos equipamentos automatizados, essenciais à rotina diária (Tabela 2).

Tipo de amostras: sangue total, expetoração e lavados brônquicos, urina, fezes, exsudados (vaginais, uretrais, purulentos), LCR, catéteres centrais, raspados de pele, fâneros.

Tabela 2: Lista de equipamentos do setor de Microbiologia no SPC do IPOCFG.

Equipamento e casa comercial	Especificações
<i>Vitek[®]2 Compact 15</i> da bioMérieux [™]	Identificação de microrganismos e estudos de suscetibilidade
<i>ATB Expression[®]</i> da bioMérieux [™]	Leitura de antibiogramas
BD <i>Bactec[™] 9050 Blood Culture System</i>	Deteção de crescimento de microrganismos em hemoculturas
<i>Cobas u 411</i> da Roche [®] Diagnostics <i>Miditron[®]ST</i> Mannheim Boehringer	Sumária de tipo II e observação do sedimento urinário
UVItect BTS 20 L	Equipamento de emissão de radiação UV utilizado para a leitura de galerias Crystal [™]
Câmara de fluxo laminar <i>Forma Scientific</i>	Utilizada para a manipulação de amostras
<i>GeneXpert[®]</i> da Cepheid	Pesquisa da toxina de <i>Clostridium difficile</i>
Outros equipamentos: vários microscópios óticos, estufas reguladas a diferentes temperaturas (25°C, 37°C e 42°C), centrífuga.	

3. Química Clínica

O setor de Química Clínica está sob a responsabilidade do Dr. Luís do Espírito Santo Nina, Assistente Hospitalar Graduado Especialista em Patologia Clínica.

Neste setor é feito o estudo de parâmetros bioquímicos em diversos tipos de amostras. A maioria das amostras analisadas consistem em soro, mas também são feitas análises bioquímicas em urina e outros líquidos orgânicos. Neste setor também se realizam gasometrias e determinação da concentração de cálcio, ambas feitas em sangue total. A determinação de todos estes parâmetros recorre a vários equipamentos automatizados (Tabela 3).

Tipo de amostras: soro, urina, líquidos orgânicos, sangue total.

Tabela 3: Lista de equipamentos do setor de Química Clínica no SPC do IPOCFG.

Equipamento e casa comercial	Especificações
<i>Cobas[®] 6000 Analyser Series HITACHI</i> da Roche [®] Diagnostics	Autoanalísadores com dois módulos c501 em cadeia
<i>Cobas[®] c311</i> da Roche [®] Diagnostics	Autoanalísador de apoio
<i>ABL 800 FLEX</i> da Radiometer [®]	Calcímetro (dois equipamentos)
<i>Rapidlab[®] 1265</i> da Siemens	Gasómetro
<i>RapidChem[™] 744</i> da Bayer [®]	Utilizado apenas para confirmação de ionogramas
<i>Reflotron[®] Plus</i> da Roche [®] Diagnostics	Analisador de química seca por refratometria, apenas para confirmação
<i>Shimadzu Spectrophotometer UV-120-02</i>	Espectrofotómetro utilizado para técnicas manuais
Outros equipamentos: duas centrífugas, banho de incubação, agitador.	

4. Endocrinologia/Imunologia

O setor de Endocrinologia e Imunologia está sob a coordenação do Dr. Nuno Alexandre Ferreira da Cunha, Técnico Superior de Saúde, Assistente de Laboratório, Licenciado em Bioquímica.

Aqui, através de imunoensaios, são doseadas hormonas, marcadores tumorais, marcadores cardíacos, e fármacos; também se doseiam proteínas de fase aguda e é efetuada a pesquisa de alguns autoanticorpos. Possui uma zona dedicada à realização de proteinogramas, imunofixações, e eletroforeses da hemoglobina e de algumas enzimas, nomeadamente a lactato desidrogenase e a fosfatase alcalina.

Apesar de ser um setor muito automatizado (Tabela 4), são muitos os doseamentos realizados através de técnicas manuais, que recorrem à utilização de radioisótopos, nomeadamente: metanefrinas, normetanefrinas, estrona, aldosterona, testosterona livre, ácido vanilmandélico, 5-OH-indolacético, e 17-OH-progesterona.

Tipo de amostras: soro, plasma, sangue total, urina.

Tabela 4: Lista de equipamentos do setor de Endocrinologia/Imunologia no SPC do IPOCFG.

Equipamento e casa comercial	Especificações
<i>Immolute2000[®]XPi + VersaCell[™]</i> da Siemens <i>Liaison[®]</i> da DiaSorin [™]	Imunoensaio de quimioluminescência (CLIA)
<i>Cobas e411 Analyser[®]</i> da Roche [®]	Imunoensaio de eletroquimioluminescência (ECLIA)
<i>ImmunoCAP[®]</i> da Thermo Scientific [™]	Imunoensaio de fluorescência enzimática (FEIA)
<i>Kryptor[®]</i> da Brahms [™]	Imunoensaio de fluorescência por 'Time-Resolved Amplified Cryptate Emission' (TRACE)
<i>Viva-E[®]</i> da Siemens	Imunoensaio por 'Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique' (EMIT)
<i>Konelab[®]</i> da Thermo Electron Corporation [™]	Imunoturbidimetria e colorimetria/espectrofotometria
<i>BN ProSpec[®]</i> da Siemens	Nefelometria
<i>Hydrasys[®]</i> da Sebia [®]	Eletroforese e imunofixação
<i>LKB Wallac 1272 CliniGamma Counter</i>	Contador gama para técnicas manuais com radioisótopos
Outros equipamentos: centrífuga e ultracentrífuga, microscópio ótico para análise de anticorpos antinucleares, <i>hotte</i> , agitadores, banho de incubação.	

CAPÍTULO 3: O SETOR DE HEMATOLOGIA

Sob a orientação da Dr.^a Joana Diamantino, bem como do Dr. Jorge Reis e do Dr. Nuno Oliveira, pude fazer parte de toda a rotina do setor de Hematologia, bem como participar na interpretação de resultados. Neste setor tomei contacto com a realização de hemogramas, determinação da velocidade de sedimentação, preparação e observação de esfregaços de sangue periférico para contagem celular e observação da morfologia, coloração e contagem de reticulócitos, testes de avaliação da hemostase, e imunofenotipagem da população leucocitária. Trabalhei não só com amostras de sangue periférico, como também com aspirados de medula óssea.

PARTE I: HEMOGRAMA E VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO

I. Velocidade de sedimentação

A velocidade de sedimentação refere-se à velocidade à qual os eritrócitos sedimentam no período de uma hora. A velocidade de sedimentação depende sobretudo do equilíbrio entre o fibrinogénio (que estimula a sedimentação), e o potencial zeta (carga negativa dos eritrócitos que causa repulsão entre as células). Num processo inflamatório, o aumento do fibrinogénio no sangue faz com que os eritrócitos se agreguem, aumentando assim a velocidade de sedimentação.

O método de referência é o método de Westergren: o sangue é aspirado para uma pipeta retilínea e graduada, colocada verticalmente sobre uma estante. A leitura é obtida pela altura da coluna de plasma, no limite de separação com os eritrócitos sedimentados, ao fim de uma hora, sendo o resultado expresso em mm/h (Henry, 2011).

No setor de hematologia do IPOCFG, o equipamento utilizado para o cálculo da velocidade de sedimentação permite obter resultados em poucos segundos, através de um método de fotometria cinética (Koepke et al., 2000). É medido o ritmo de formação dos agregados de eritrócitos e o seu tamanho, na fase de agregação: durante 20 segundos, a densidade ótica da amostra é medida 1000 vezes, num sistema capilar. Um algoritmo matemático converte esta leitura da densidade ótica em mm/hora.

A velocidade de sedimentação é utilizada como um indicador não específico de processos inflamatórios (Kanfer et al., 1997), mas também se encontra aumentada em condições fisiológicas como a gravidez e envelhecimento.

2. Hemograma

As amostras de sangue total para realização de hemogramas são colhidas em tubos contendo EDTA como anticoagulante. O EDTA funciona como um agente quelante dos íons de cálcio, inibindo o processo de coagulação. Cada amostra é identificada com o código de barras respectivo ao dar entrada no setor, e só depois é colocada no equipamento.

Uma vez no interior do equipamento, parte da amostra é recolhida e posteriormente separada para várias câmaras onde, aplicando diferentes princípios de funcionamento, são obtidos os parâmetros do hemograma.

2.1. Princípio de funcionamento do aparelho

O aparelho utilizado no setor de Hematologia para a realização do hemograma utiliza diferentes princípios para efetuar a análise da amostra, nomeadamente o princípio Coulter, tecnologia VCS, e espectrofotometria.

O método baseado no princípio Coulter, ou princípio da impedância, baseia-se no facto de que partículas em movimento num campo elétrico causam distúrbios mensuráveis e proporcionais ao seu tamanho. Cria-se assim um pulso elétrico que pode ser quantificado. O número de pulsos indica a quantidade de partículas, e a amplitude do pulso é proporcional ao volume celular (Waterman et al., 1975). Deste modo é feita a contagem dos leucócitos, eritrócitos e plaquetas.

A tecnologia VCS combina três métodos. O volume celular é medido segundo o princípio da impedância. A condutividade analisa a composição química da célula e o seu volume nuclear. A dispersão ('scatter') da luz utiliza um laser de hélio-néon, e analisa o volume ('forward-scatter') e a complexidade celular ('side-scatter'). A fórmula leucocitária é obtida utilizando esta tecnologia, assim como a contagem de reticulócitos.

A espectrofotometria é utilizada pelo equipamento para a determinação da concentração de hemoglobina.

Os dados do hemograma podem ser obtidos diretamente, calculados a partir de fórmulas aplicadas pelo equipamento, ou obtidos a partir dos histogramas realizados (Tabela 5).

Tabela 5: Métodos utilizados e respectivos parâmetros (Fonte: Coulter LH750 System Help, 2011).

	Método	Parâmetros medidos
Direto	Princípio da impedância	Eritrócitos, leucócitos e plaquetas
	VCS	Diferencial e reticulócitos (%)
	Espetrofotometria	Hemoglobina
	Derivados de histogramas	VCM, RDW, VPM
	Calculados	Hematócrito, HCM, CHCM

2.2. Hemograma: eritrograma

Diariamente são produzidos, num adulto saudável, aproximadamente 10^{12} eritrócitos, através do complexo processo da eritropoiese, regulado pela eritropoietina (Hoffbrand, 2011). O pronormoblasto é o primeiro precursor reconhecível do eritrócito na medula óssea. Através de divisões sucessivas, esta célula de grandes dimensões dá origem a eritrócitos maduros, que circulam no sangue periférico (Hoffbrand, 2011). Também os reticulócitos, precursores dos eritrócitos maduros, circulam em pequena quantidade no sangue periférico.

RBC ('Red Blood Cell')

Consiste na quantidade de eritrócitos, medida diretamente pelo equipamento. É expresso como:

$$n \times 10^6 \text{ células}/\mu\text{L}$$

Concentração de hemoglobina (Hgb)

É diretamente calculada pelo equipamento por espectrofotometria, sendo o resultado expresso em g/dL.

VCM (volume corpuscular médio)

Representa o volume médio de cada eritrócito, derivado a partir do histograma criado pelo equipamento para a população de eritrócitos.

RDW ('Red cell Distribution Width')

Este parâmetro avalia a distribuição do tamanho da população de eritrócitos, e é equivalente a um coeficiente de variação, expresso em percentagem.

Hematócrito (Hct)

O hematócrito é volume ocupado pelos eritrócitos num dado volume de sangue. É obtido através da aplicação da seguinte fórmula:

$$\text{HCT (\%)} = (\text{RBC} \times \text{VCM}) / 10$$

HCM (hemoglobina corpuscular média)

Avalia a quantidade média de hemoglobina presente em cada eritrócito. Este parâmetro é obtido a partir da fórmula:

$$\text{HCM (pg)} = (\text{Hgb/RBC}) \times 10$$

CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média)

É uma estimativa da concentração média de hemoglobina presente nos eritrócitos, calculada a partir da fórmula:

$$\text{CHCM (g/dL)} = (\text{Hgb/Hct}) \times 100$$

Reticulócitos

A sua quantidade é calculada diretamente pelo equipamento, e o resultado é expresso em %, traduzindo o número de reticulócitos por 100 eritrócitos.

Os valores de referência para cada um dos parâmetros do eritrograma encontram-se referenciados na Tabela 6.

Tabela 6: Valores de referência para os índices eritrocíticos.

Parâmetro	Valor de referência	Unidade
RBC	4,5 – 6,5	$10^6/\mu\text{L}$
Conc. de hemoglobina	13 – 18	g/dL
VCM	85 – 95	fL
RDW	11,5 – 14,5	%
Hematócrito	35 – 47	%
HCM	27 – 32	pg
CHCM	32 – 36	g/dL
Reticulócitos	0,5 – 1,5	%

A patologia mais frequente relacionada com os eritrócitos é a anemia. A anemia é definida como a redução da concentração de hemoglobina para um nível abaixo do normal para a idade e sexo (Hoffbrand, 2011). Em termos laboratoriais, a classificação da anemia é feita principalmente a partir do valor do VCM e HCM. As anemias são assim classificadas em microcíticas, normocíticas ou macrocíticas; hipocrômicas ou normocrômicas (Tabela 7).

Tabela 7: Classificação da anemia (Adaptado de: Hoffbrand, 2011).

	Microcítica hipocrômica	Normocítica normocrômica	Macrocítica
Parâmetros afetados	VCM <80 fL HCM <27 pg	VCM 80-95 fL HCM \geq 27 pg	VCM >95 fL
Exemplo	Anemia ferropénica	Anemia da doença crónica	Anemia megaloblástica

2.3. Hemograma: leucograma

Os leucócitos subdividem-se em dois grupos: os fagócitos, onde se incluem os granulócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) e os monócitos; os imunócitos, onde estão incluídos os linfócitos. Os fagócitos são formados na medula óssea a partir de um precursor comum, o mieloblasto. Os linfócitos desenvolvem-se nos órgãos linfoides primários – medula

óssea e timo (Hoffbrand, 2011). Os valores de referência para cada uma das subpopulações de leucócitos encontram-se referenciados na Tabela 8.

Tabela 8: Valores de referência do diferencial leucocitário.

Parâmetro	Valor de referência absoluto ($10^3/\mu\text{L}$)	Valor de referência relativo (%)
Leucócitos	4,0 – 11,0	100
Subpopulação	Neutrófilos	45 – 70
	Linfócitos	20 – 40
	Monócitos	3 – 10
	Eosinófilos	1 – 5
	Basófilos	0 – 2

O estudo da série branca evidencia, por exemplo, estados infecciosos ou neoplasias hematológicas (Tabela 9). Para além de uma alteração na concentração (absoluta ou relativa), os leucócitos podem também apresentar alterações morfológicas, detetáveis na observação do esfregaço de sangue periférico.

Tabela 9: Alguns exemplos das alterações quantitativas mais comuns associadas à série branca.

População	Alteração	Causa associada
Neutrófilos	Neutrofilia	Infeção bacteriana, fatores de crescimento
	Neutropenia	Fármacos, congénito
Linfócitos	Linfocitose	Mononucleose, LLC
	Linfopenia	Imunodeficiência
Monócitos	Monocitose	Infeção bacteriana, LMMC
Eosinófilos	Eosinofilia	Alergia, helmintas
Basófilos	Basofilia	LMC

2.4. Hemograma: plaquetas

As plaquetas são produzidas na medula óssea a partir da fragmentação do citoplasma dos megacariócitos. Os megacariócitos maturam ao longo de sucessivas replicações mitóticas, sem que ocorra divisão do citoplasma, o que origina uma célula de grandes dimensões com múltiplos lóbulos nucleares. A principal função das plaquetas consiste na formação do rolhão plaquetar em resposta a danos nos vasos sanguíneos.

O valor de referência da contagem de plaquetas é de 150 a $450 \times 10^3/\mu\text{L}$. A diminuição do número de plaquetas abaixo do valor de referência é denominada de trombocitopenia; o aumento do número de plaquetas é denominado de trombocitose.

3. Esfregaço de sangue periférico: coloração de Wright-Giemsa

Quando o hemograma apresenta alterações significativas ou surgem alertas, ou quando pedido pelo médico, deve ser efetuado um esfregaço de sangue (Figura 1) para observação e confirmação dos resultados. A coloração utilizada é a coloração de Wright-Giemsa, com recurso a equipamento automático. Inicialmente, é utilizado metanol como fixador, e seguidamente são usados dois corantes: o azul de metileno cora granulações basófilas e também os núcleos das células, que adquirem várias tonalidades de azul a roxo; a eosina cora o citoplasma celular e a granulação acidófila, como a presente nos eosinófilos, com tonalidades de rosa a laranja.

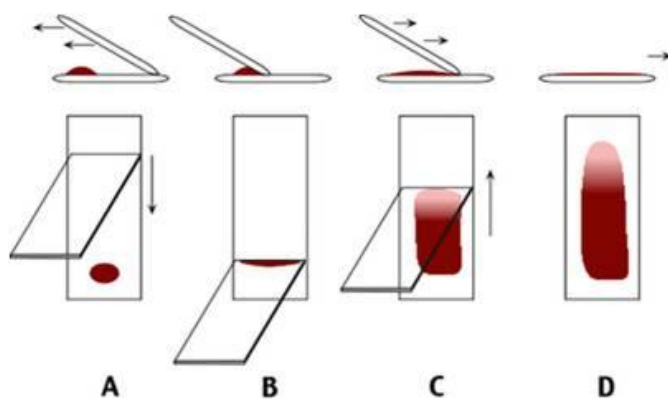


Figura 1: Modo correto de efetuar um esfregaço de sangue periférico.

(Fonte: http://www.geocities.ws/mtjaved_uaf/system1.jpg)

3.1. Aspirados de medula óssea

Para além das amostras de sangue total que diariamente são analisadas neste setor, são também analisados aspirados de medula óssea. O aspirado é enviado para o laboratório juntamente com várias lâminas com esfregaços realizados no momento da colheita. São efetuados novos esfregaços a partir da amostra, sendo depois corados pela coloração de Wright-Giemsa (Figura 2). Alguns esfregaços são reservados para se efetuar a coloração de Perls (Figura 2).

Os esfregaços são visualizados no microscópio ótico, iniciando-se a observação na objetiva de 10x para avaliação global da celularidade dos fragmentos, presença de megacariócitos, células reticulares e células em divisão. Posteriormente é efetuada a contagem e avaliação morfológica com objetiva de maior ampliação. Os esfregaços corados pela coloração de Perls são observados para avaliação da presença de depósitos de ferro na medula.

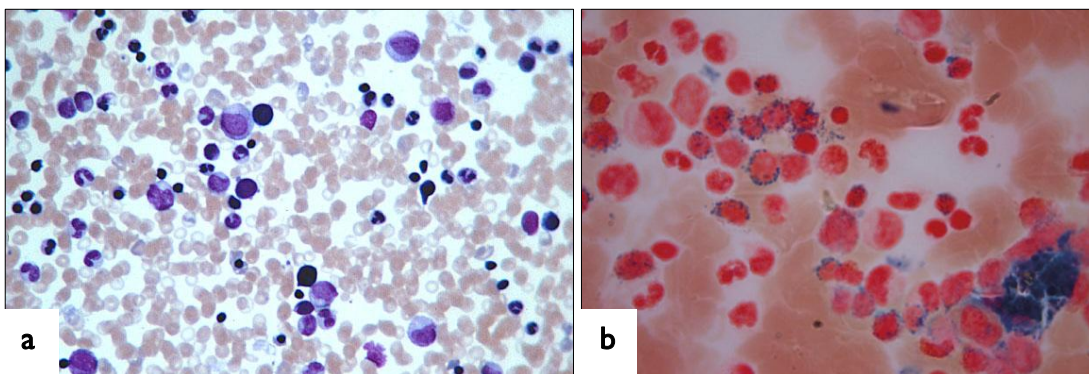


Figura 2: Exemplos de esfregaços de aspirados de medula óssea.
(a. coloração de Wright; b. coloração de Perls)

(Fonte: <http://www.bu.edu/histology/p/018010oa.htm>; <http://tidsskriftet.no/image/2012/T-11-0608-01-ENG-Nol.jpg>)

PARTE II: HEMOSTASE

Está para além do âmbito deste relatório uma revisão exaustiva da hemostase e das suas diferentes vias, mas não deixa de ser importante abordar este tema complexo através de uma breve introdução.

A hemostase pode definir-se como um delicado equilíbrio entre mecanismos pró coagulantes e mecanismos anticoagulantes, sendo ambos igualmente importantes para a manutenção deste sistema. A hemostase pode ser dividida em três fases: hemostase primária

(adesão e agregação plaquetar e formação do trombo plaquetário); hemostase secundária (formação do coágulo de fibrina insolúvel) e fibrinólise (dissolução do coágulo).

Na hemostase secundária, a produção de fibrina envolve um processo denominado de cascata da coagulação; nela estão incluídas as vias extrínseca, intrínseca e comum (Figura 3). A cascata de coagulação engloba de uma série de enzimas (denominadas “fatores de coagulação”, sintetizados no fígado) que se ativam sucessivamente, com o objetivo final de produzir fibrina a partir de fibrinogénio. A *via extrínseca* é ativada pelo fator tecidual (TF), que é libertado pelas células quando ocorre um dano no endotélio, e que por sua vez ativa o fator VII. A *via intrínseca* inicia-se com a fase de contacto, quando a pré-caliceína (PK), o cininogénio de alto peso molecular (HWHK), e os fatores XI e XII são expostos a cargas negativas do vaso lesado. A *via comum* pode ser ativada quer pela via intrínseca, quer pela via extrínseca, é a última fase da cascata da coagulação, e consiste nos fatores X, V, II (trombina), e fibrinogénio: os fatores V e X ativados levam à conversão da protrombina em trombina, que por sua vez converte o fibrinogénio em fibrina (Krafts, 2011). É de salientar, no entanto, que esta separação entre as diferentes vias não ocorre *in vivo*; trata-se de uma divisão teórica que facilita a compreensão de todo o processo.

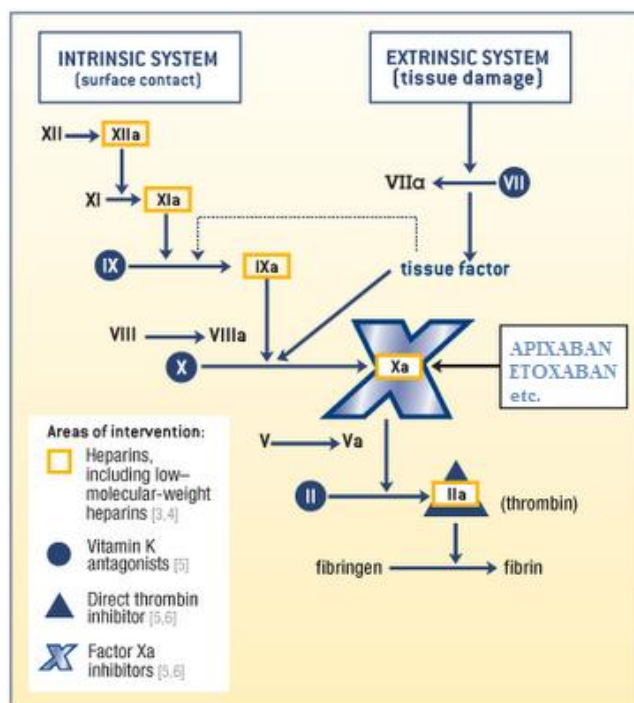


Figura 3: Representação esquemática da cascata da coagulação.

(Fonte: <http://concerningheart.blogspot.pt/2008/12/low-molecular-weight-heparin.html>)

A síntese dos fatores envolvidos na cascata ocorre a nível hepático e tem a particularidade de os fatores II, VII, IX e X necessitarem de vitamina K para a sua maturação.

Na fibrinólise há dissolução do coágulo de fibrina. As proteínas envolvidas neste processo incluem: t-PA e plasmina. A t-PA liga-se à fibrina e converte o plasminogénio a plasmina, que por sua vez converte a fibrina em produtos de degradação da fibrina.

Várias proteínas mantêm a cascata de coagulação (e consequentemente a formação de fibrina) sob controlo. Estes anticoagulantes naturais incluem: TFPI, antitrombina, proteína C e proteína S.

Todos os estudos de hemostase são feitos em plasma pobre em plaquetas, obtido por centrifugação das amostras de sangue total colhido em tubos com citrato de sódio como anticoagulante. O citrato de sódio é um quelante dos iões de cálcio extremamente eficaz. A captação de todo o cálcio é de extrema importância, uma vez que o cálcio funciona como catalisador na conversão da protrombina a trombina.

De um modo geral, todos os testes de coagulação se realizam da seguinte maneira: ao plasma em estudo são adicionados os reagentes necessários a cada teste; e é medido o tempo que decorre desde a adição dos reagentes até à formação de fibrina. A adição de reagentes e o cálculo dos resultados são realizados pelo equipamento.

Tempo de protrombina (PT)

Neste teste é adicionada tromboplastina (semelhante ao fator tecidual) e cálcio à amostra em estudo, ativando-se a via extrínseca. A tromboplastina ativa o fator VII, formando um complexo que, na presença de iões de cálcio, é responsável pela transformação da protrombina em trombina. O PT avalia assim a atividade dos fatores VII, X, V e II, e fibrinogénio.

Um prolongamento do PT pode surgir por várias causas:

- Deficiência ou inibição de fatores da via extrínseca ou da via comum (insuficiência hepática, deficiência ou má absorção da vitamina K);
- Toma de anticoagulantes orais (por exemplo, a varfarina inibe o ciclo da vitamina K, interferindo com a atividade dos fatores II, VII, IX e X);
- Coagulação intravascular disseminada.

International Normalized Ratio (INR)

Com o objetivo de uniformizar os resultados de pacientes submetidos a anticoagulantes orais, foi introduzido um procedimento de padronização válido internacionalmente para a tromboplastina, tendo em conta o valor de ISI (Índice de Sensibilidade Internacional) fornecido pelo fabricante. O INR obtém-se recorrendo à seguinte fórmula:

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{PT do paciente}}{\text{PT de "pool" normal}} \right)^{\text{ISI}}$$

O PT da “pool” de plasma normal é obtido através da média aritmética do tempo de coagulação de 20 plasmas normais.

O resultado de um teste de PT é fornecido sob três formas: o tempo em segundos (11,6 + 3 segundos); em percentagem de atividade ou protrombinémia; e o INR (~ 1 em pacientes saudáveis).

Tempo de tromboplastina parcial (PTT)

Neste teste, através da adição de fosfolípidos e cálcio à amostra de plasma em estudo, é ativada a via intrínseca (e não a extrínseca, uma vez que não é adicionada tromboplastina). O PTT é sensível relativamente a anomalias na atividade dos fatores VIII, IX, XI, XII, PK, HWHK e fibrinogénio. Entre as causas possíveis para um prolongamento do PTT encontram-se as seguintes:

- Deficiência ou inibição de fatores da via intrínseca ou da via comum (hemofilia, insuficiência hepática, deficiência ou má absorção da vitamina K, anticoagulante lúpico);
- Terapia com heparina (o PTT é teste mais indicado para a monitorização da terapêutica com heparina, pois a via intrínseca é a mais afetada);
- Coagulação intravascular disseminada.

PTT da mistura

Quando o resultado de um teste de PTT surge prolongado (sendo que o valor de referência é de 27,9 + 6 segundos), a realização de um teste de PTT da mistura permite a distinção entre duas possíveis causas para o prolongamento do PTT: existência de inibidores, ou deficiência de fatores de coagulação.

Um teste de PTT da mistura consiste na adição de plasma normal ao plasma do paciente em estudo, na proporção de 1:1. Logo, é possível retirar duas conclusões relativamente ao resultado obtido a partir da mistura:

- se o PTT da mistura é normal: o plasma do paciente apresenta então deficiência de fatores;
- se o PTT da mistura é prolongado: há presença de inibidores da coagulação no plasma do paciente.

Tempo de trombina (TT)

Através da adição de trombina ao plasma em estudo, é avaliada a conversão do fibrinogénio a fibrina, que é o último passo da via comum. Ao adicionar trombina à amostra, essa conversão é feita sem que sejam ativadas as vias intrínseca e extrínseca. O valor de referência é de 11,0 + 3 segundos, e um prolongamento do resultado pode dever-se a:

- Deficiência de fibrinogénio (quantitativa ou qualitativa);
- Terapêutica com heparina ou dabigatrano (inativam a trombina);
- Presença de produtos de degradação da fibrina (inibem a conversão do fibrinogénio a fibrina).

Fibrinogénio

O fibrinogénio é sintetizado no fígado e rapidamente se esgota durante o processo de coagulação. Sob a ação da trombina, é convertido em fibrina, sendo o fator final na cascata de coagulação. O valor de referência situa-se entre os 200 a 400 mg/dL, valor que pode encontrar-se diminuído em casos de insuficiência hepática, ou de coagulação intravascular disseminada (quando o fibrinogénio é esgotado devido à extensa formação de coágulos).

D-dímeros

Os D-dímeros resultam da degradação específica da fibrina. Este teste apresenta assim uma grande vantagem relativamente à medição dos produtos de degradação da fibrina, pois estes produtos surgem quer quando a plasmina degrada a fibrina, quer quando degrada o fibrinogénio. É um teste extremamente sensível, e deteta pequenas alterações na quantidade de D-dímeros no sangue. Devido à sua sensibilidade elevada, o seu valor pode encontrar-se aumentado em muitas situações:

- Qualquer estado trombótico anormal (trombose venosa profunda, coagulação intravascular disseminada, embolia pulmonar);
- Existência de tumores (devido à angiogénese, surgem novos vasos sanguíneos revestidos de fibrina);
- Quimioterapia.

Anticoagulante lúpico (AL)

O anticoagulante lúpico é um anticorpo presente no chamado síndrome antifosfolípídico, estando presente em cerca de 10% dos doentes com lúpus eritematoso sistémico e em pacientes com outras doenças autoimunes (que frequentemente possuem anticorpos para outros antígenos lipídicos). O anticoagulante lúpico não está associado a risco hemorrágico, mas há risco aumentado de trombose venosa ou arterial (Hoffbrand, 2011).

O AL interfere *in vitro* com as fases da coagulação dependentes de lipoproteínas, sendo usualmente detetado pelo prolongamento do PTT que não corrige após a mistura.

A pesquisa do anticoagulante lúpico é feita recorrendo ao dRVVT ('dilute Russell's Viper Venom time'), que utiliza reagentes contendo veneno da víbora de Russell, um veneno isolado da espécie *Daboia russelli* que contém um potente ativador do fator X, possibilitando a conversão do fibrinogénio a fibrina na presença de cálcio, sem que ocorram as vias extrínseca e intrínseca. É feito um teste de screening e um teste de confirmação (Tabela 10).

Tabela 10: Pesquisa de AL e interpretação de resultados.

	dRVVT de screening	dRVVT de confirmação
Reagente	RVV, fosfolípidos em baixa concentração, cálcio.	RVV, fosfolípidos em concentração elevada, cálcio.
Princípio do teste	Os fosfolípidos em baixa concentração aumentam a sensibilidade do teste, pois se o AL estiver presente, ainda que em pequena quantidade, a coagulação será afetada, levando a um prolongamento do tempo do teste.	A alta concentração de fosfolípidos permite evitar que o AL, se presente, afete o tempo do teste, pois há um excesso de fosfolípidos relativamente ao anticorpo.
Interpretação de resultados	<u>Tempo normal</u> : sem presença de AL. <u>Tempo prolongado</u> : presença de AL ou deficiência em fatores.	<u>Razão tempo de screening/tempo de confirmação > 1,2</u> : confirma presença de AL.

PARTE III: IMUNOFENOTIPAGEM

O diagnóstico, classificação e monitorização de neoplasias hematopoiéticas beneficiaram grandemente com a aplicação de estudos imunofenotípicos (Henry, 2011). A imunofenotipagem é atualmente de extrema importância na elaboração do diagnóstico, monitorização e prognóstico da doença. No SPC são realizados testes de imunofenotipagem da população leucocitária, recorrendo à citometria de fluxo.

1. Citometria de fluxo

A imunofenotipagem recorre à citometria de fluxo; esta é uma técnica rápida e conveniente para a obtenção de dados imunofenotípicos, pois possibilita uma análise multiparamétrica das células.

Através desta tecnologia, são analisadas múltiplas características das partículas em estudo (normalmente células), à medida que fluem numa corrente de líquido isotónico através de um feixe de luz. As propriedades medidas incluem: tamanho, complexidade, e intensidade da fluorescência. A utilização de anticorpos marcados com diferentes fluorocromos possibilita a análise simultânea de vários antigénios celulares (de superfície ou intracelulares).

Um citómetro de fluxo é constituído por três sistemas principais: o sistema de fluido, que transporta as partículas até ao feixe de laser; o sistema ótico, que consiste em lasers que iluminam as partículas, e filtros adequados que redirecionam os sinais resultantes para os detetores apropriados; e o sistema eletrónico, que converte os sinais de luz em sinais eletrónicos.

À medida que cada partícula passa pelo feixe de laser do aparelho, há uma dispersão da luz; e, na presença de um fluorocromo, vai também haver emissão de fluorescência. A dispersão da luz irá depender das características da partícula, nomeadamente do seu tamanho ('forward-scattered light') e complexidade ('side-scattered light').

2. Resultados

Após a recolha dos dados, são criados histogramas com os resultados. Podem fazer-se inúmeras combinações com os parâmetros analisados, utilizando 'software' adequado, de modo a facilitar a sua interpretação.

A identificação de neoplasia hematopoiética por imunofenotipagem baseia-se no princípio de que as células neoplásicas expressam padrões de expressão antigénica distintamente diferentes dos expressados por uma população celular normal. A expressão de antigénios em células normais é um processo altamente regulado, que resulta num padrão característico de aquisição e perda de antigénios ao longo da maturação da célula; este padrão é específico para cada linha celular. Células neoplásicas demonstram muitas vezes alterações na expressão de antigénios:

- Ganho de antigénios que normalmente não são expressos por aquele tipo ou linha celular;
- Níveis de expressão de antigénio anormalmente aumentados ou diminuídos, incluindo uma perda completa de antigénios normais nalgumas situações;
- Expressão de antigénios não sincronizada, ou seja, expressão de antigénios normais para o tipo ou linha celular, mas num momento inapropriado da maturação;
- Expressão anormalmente homogénea de um ou mais antigénios por uma população que normalmente apresenta uma expressão heterogénea.

A identificação imunofenotípica de neoplasia hematopoiética necessita assim de um conhecimento profundo dos padrões normais de expressão de antigénios pelas células

hematopoiéticas (Henry, 2011). A imunofenotipagem permite detetar e caracterizar padrões de expressão anormais, fornecendo dados de extrema importância para o diagnóstico, prognóstico, ou deteção de doença residual no paciente.

PARTE IV: PESQUISA DO GENE BCR-ABL

Designa-se de cromossoma Philadelphia a translocação recíproca entre o braço longo dos cromossomas 9 e 22. O resultado desta translocação é a criação de um gene de fusão: o gene *Ab//* do cromossoma 9 junta-se a uma parte do gene *BCR* do cromossoma 22. O gene BCR-ABL resultante codifica a proteína Bcr-abl, uma tirosina cinase mutada que permanece permanentemente ativada, resultando em divisão celular descontrolada.

Cerca de 95% dos pacientes com LMC possuem esta anormalidade cromossómica (Talpaz et al., 2006). A principal vantagem dos testes de deteção do gene BCR-ABL é a monitorização dos doentes em tratamento e deteção de doença residual. O método utilizado é altamente sensível e consiste em RT-PCR em tempo real, detetando esta translocação em linfócitos do sangue periférico em menos de duas horas.

PARTE V: CONTROLO DE QUALIDADE

O setor de Hematologia realiza sistematicamente controlo de qualidade interno e controlo de qualidade externo.

I. Controlo de qualidade interno

O controlo de qualidade interno é feito recorrendo a amostras disponíveis comercialmente. A nível do hemograma e contagem celular, são diariamente medidos três controlos (nível alto, baixo, e normal), antes de serem iniciadas as análises das amostras dos pacientes. O controlo para a contagem de reticulócitos é realizado quando necessário, sendo avaliados também três níveis (alto, baixo, e normal). A velocidade de sedimentação é controlada semanalmente.

Relativamente aos testes de hemostase, é utilizado diariamente um controlo de nível normal para os seguintes parâmetros: PT, PTT, TT, D-dímeros, e fibrinogénio. São também utilizados dois níveis de controlo patológicos, processados alternadamente. Os controlos

para o anticoagulante lúpico, fator de von Willebrand, e fatores V, VII e VIII são feitos apenas quando esse pedido surge nas análises do dia.

2. Controlo de qualidade externo

O laboratório participa em dois programas de avaliação externa da qualidade: Randox International Quality Assessment Scheme (RIQAS); e o Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ), do INSA.

O programa RIQAS é feito mensalmente e inclui controlos externos de contagem celular (hemograma) e alguns testes de hemostase (PT, PTT, TT, fibrinogénio, atividade do fator VIII, atividade das proteínas C e S, e AT III).

O programa PNAEQ avalia também diversos parâmetros, com uma periodicidade variável: os controlos externos de contagem celular e hemostase (que incluem PT, PTT, TT, fibrinogénio, e antitrombina) são feitos trimestralmente. O controlo externo para avaliação da contagem de reticulócitos é feito semestralmente. Este programa inclui ainda uma componente de avaliação da morfologia celular, sendo enviados ao laboratório três lâminas com esfregaços de sangue periférico acompanhadas de uma breve história clínica. Este controlo é feito também trimestralmente.

CAPÍTULO 4: O SETOR DE MICROBIOLOGIA

Sob a orientação da Dr.^a Paula Gama, tomei contacto com o mundo da microbiologia, observando bactérias, fungos e parasitas, efetuando análises a diversos tipos de produtos biológicos e participando ativamente na interpretação e discussão dos resultados das referidas análises.

Na área da bacteriologia e micologia tive a oportunidade de processar e analisar resultados de amostras tão variadas como urina, expetoração e lavados brônquicos, fezes, sangue, exsudados purulentos e exsudados vaginais e LCR. Também aprendi como processar e analisar catéteres centrais.

Na área de parasitologia tive sobretudo contacto com exames parasitológicos de fezes, mas esta área da microbiologia tem também relevância na análise de exsudados vaginais.

Trabalhar num laboratório de microbiologia exige cuidados especiais: não só se pretende evitar a contaminação de quem manipula as amostras, como é também importante evitar que as amostras sejam contaminadas por quem as manipula. Um laboratório de microbiologia é um local especialmente capaz de promover a disseminação de microrganismos potencialmente patológicos, pelo que é crucial seguir todas as regras de segurança e minimizar ao máximo este risco inerente a quem ali trabalha.

A esterilização é o ponto chave para o sucesso do trabalho feito no laboratório de microbiologia e todo o material utilizado para recolher e manipular as amostras deve ser estéril, de modo a não comprometer os resultados. Para além disso, são necessárias técnicas adequadas de trabalho, que implicam a manipulação da amostra em ambiente estéril, quer usando um bico de Bunsen, quer trabalhando em câmara de fluxo laminar. Devem tratar-se todas as amostras como sendo potencialmente perigosas: quem trabalha com os produtos biológicos deve utilizar luvas e bata, abster-se de falar ou efetuar movimentos bruscos durante a manipulação dos produtos, e saber inocular corretamente os meios de cultura de modo a obter colónias isoladas.

PARTE I: COLHEITA E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS

O laboratório de microbiologia pode fornecer informação crucial para o diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas, mas só o poderá fazer se as amostras forem de boa qualidade, em quantidade suficiente, colhidas adequadamente e acompanhadas por informação clínica pertinente (Fonseca et al., 2004).

É fulcral evitar a contaminação da amostra com a flora saprófita do paciente ou com microrganismos ambientais. Se possível, as amostras devem ser recolhidas antes de se iniciar terapêutica antibiótica. Deve recolher-se uma quantidade suficiente do produto para um recipiente estéril apropriado e identificar de modo legível cada amostra com os dados necessários. É de salientar que há exames microbiológicos que exigem a colheita de várias amostras em dias diferentes, como é o caso do exame parasitológico de fezes ou pesquisa de micobactérias na expetoração, pelo que se deve ter em atenção o que é pedido na requisição e proceder de modo adequado. No caso de se pretender realizar pesquisa de microrganismos anaeróbios, a colheita deve também ser realizada de modo adequado, utilizando meio de transporte apropriado ou recolhendo a amostra para uma seringa fechada para impedir o contacto com o oxigénio.

As amostras devem depois ser levadas o mais rapidamente possível ao laboratório. No IPOCFG, as amostras são entregues de imediato, e processadas assim que chegam ao setor de Microbiologia. No entanto, caso haja algum impedimento ao seu transporte imediato, devem refrigerar-se ou ser colocadas em meio de transporte apropriado (com exceção das hemoculturas, que podem ser mantidas à temperatura ambiente, e do LCR, que deve ser mantido a 35°C numa estufa, sendo importante evitar que a amostra seja submetida a mudanças bruscas de temperatura).

PARTE II: IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS

I. Exame direto a fresco

É de extrema importância o exame macroscópico direto da amostra, uma vez que podem observar-se características que levem à rejeição da amostra, ou encontrar indícios que sejam úteis para a identificação do agente microbiológico em causa.

O exame microscópico direto a fresco consiste na observação direta da amostra, sem fixação ou coloração prévia, permitindo assim a observação dos microrganismos vivos, preservando a sua morfologia e mobilidade. Também se observam outras características, como o tipo de agrupamento das bactérias, ou a presença de outras células na amostra.

2. Exame direto com coloração: coloração de Gram

Desenvolvida por Hans Christian Gram em 1882, é a coloração mais utilizada em microbiologia e permite diferenciar as bactérias em dois grandes grupos: bactérias de Gram positivo e bactérias de Gram negativo, sendo por isso uma coloração diferencial. A coloração de Gram baseia-se nas características físicas e químicas da parede celular dos microrganismos, sendo que certas bactérias possuem a capacidade de reter o corante primário após a descoloração com álcool-acetona. Esta capacidade deve-se sobretudo ao conteúdo de peptidoglicano presente na parede celular.

As bactérias de Gram positivo possuem uma camada externa de peptidoglicano espessa. As bactérias de Gram negativo também possuem peptidoglicano, mas numa camada muito mais fina; para além disso, possuem uma membrana externa constituída por lipopolissacarídeos e fosfolípidos. Assim, as bactérias de Gram positivo mantêm a coloração roxa do corante primário (violeta de genciana), enquanto que as bactérias de Gram negativo sofrem descoloração e incorporam depois o corante secundário (fucsina), adquirindo uma coloração rosa-avermelhada.

Para além da distinção entre bactérias de Gram positivo e de Gram negativo, esta técnica permite também observar a morfologia e o agrupamento das bactérias, e ter uma noção da sua quantidade no produto em análise.

3. Exame direto com coloração: coloração de Ziehl-Neelsen

Descrita pela primeira vez por Franz Ziehl e Friedrich Neelsen, esta coloração é usada na pesquisa de bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR), do género *Mycobacterium*. Estas bactérias possuem uma parede celular muito característica, constituída por uma camada de peptidoglicano ligada a arabino-galactano, que está por sua vez ligado a ácidos micólicos. É esta estrutura peculiar que impede a passagem do solvente (ácido-álcool) durante o processo de descoloração, retendo assim a coloração primária; daí a denominação de «ácido-álcool resistentes», pois resistem fortemente à descoloração.

O corante primário é a fucsina fenicada básica que é utilizada a quente, corando todas as bactérias presentes de vermelho. Após a descoloração, o azul de metileno adicionado funciona como um corante de contraste, pois os BAAR são resistentes à descoloração e mantêm a cor vermelha, enquanto que outros microrganismos e o resto da preparação ficam corados de azul.

Existem também técnicas para fazer a coloração de Ziehl-Neelsen a frio, sem necessidade de aquecer a lâmina e evitando assim a libertação dos vapores tóxicos. No entanto, a qualidade final da coloração pode ficar comprometida, quando comparada com a técnica clássica a quente.

4. Provas clássicas

Prova da catalase: permite identificar as bactérias que possuem atividade da catalase e é frequentemente utilizada para distinguir as bactérias do género *Staphylococcus*, que são catalase positiva, das do género *Streptococcus*, que são catalase negativa. A catalase é uma enzima que decompõe o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio, e um resultado positivo caracteriza-se pelo rápido aparecimento de bolhas, o que evidencia a atividade da enzima.

Prova da coagulase: é normalmente feita após um teste da catalase positivo, que confirma a presença de estafilococos. Um resultado positivo caracteriza-se pela presença de um coágulo numa pequena quantidade de plasma, quando incubado com colónias da bactéria suspeita. O *Staphylococcus aureus* tem coagulase positiva e é um agente causador de infeções muito comum.

Prova da oxidase: o objetivo desta prova é distinguir quais as bactérias que possuem a enzima citocromo oxidase. É sobretudo utilizada em bacilos de Gram negativo, para distinguir enterobactérias (oxidase negativa) de outros bacilos de Gram negativo (oxidase positiva), como por exemplo *Pseudomonas*. Esta enzima é reduzida pelo composto presente nos discos de teste, o que leva à oxidação do mesmo, surgindo uma coloração roxa no disco usado, o que indica um resultado positivo.

Prova da urease: é utilizada em diversos casos; permite por exemplo fazer a distinção entre espécies de enterobactérias (por exemplo, *Proteus* ou *Klebsiella*). A urease degrada a ureia presente no meio líquido do teste, levando à sua alcalinização. Devido ao indicador de pH presente no meio, este muda de cor para rosa forte.

5. Outras provas

Estreptococos: teste de aglutinação em látex Avipath® Strep

Após a observação presuntiva de estreptococos β -hemolíticos, a realização deste teste é útil na sua identificação, pois permite identificar os grupos de Lancefield A, B, C, D, F e G. Utilizando partículas de látex revestidas com anticorpos específicos de cada grupo, irá ocorrer aglutinação se estiver presente o antigénio respetivo, permitindo uma identificação rápida do grupo ao qual pertence a bactéria. É de salientar, no entanto, que *Streptococcus pneumoniae*, um dos mais importantes do género, não é classificável pelo teste de Lancefield, pois é α -hemolítico.

6. Métodos de identificação e testes de suscetibilidade automatizados

Sistema Vitek®

É atualmente um dos equipamentos mais importantes no laboratório de microbiologia do IPOCFG. O sistema Vitek® destina-se à identificação e realização de testes de sensibilidade de bactérias e leveduras com relevância clínica. Uma interface informática transfere automaticamente os resultados para o sistema de informação do laboratório e para vários relatórios de produtos e de doentes. É o principal meio de realização de identificações e testes de suscetibilidade usado no laboratório de microbiologia do IPOCFG, facilitando e automatizando todo o processo.

Este equipamento baseia-se na utilização de cartas de plástico com 64 poços de crescimento para testes biológicos, sendo que cada poço contém uma suspensão de um substrato bioquímico ou antibiótico.

Antes da utilização deste sistema, é essencial saber qual o tipo de bactéria que se quer identificar, pois existem cartas de identificação para bactérias de Gram negativo, de Gram positivo, anaeróbios e leveduras, bem como uma carta para bactérias do género *Neisseria* ou *Haemophilus*. Relativamente aos testes de suscetibilidade, existem cartas para bactérias de Gram positivo e de Gram negativo, e para leveduras.

Após a obtenção de uma cultura pura num meio sem antibióticos, que podem interferir com os resultados, deve preparar-se uma suspensão da bactéria/levedura, de concentração pré-definida. O tubo contendo essa suspensão é então colocado no equipamento Vitek® juntamente com as cartas adequadas para a identificação e testes de

suscetibilidade. A suspensão é aspirada para o interior das cartas, que permanecem em incubação e são monitorizadas regularmente pelo sistema ótico de transmissão para verificação do crescimento bacteriano em cada poço.

No dia seguinte são verificados os resultados obtidos, que são transmitidos para o sistema informático. Os resultados dos testes de suscetibilidade são também analisados, pois é informação relevante a fornecer ao médico o mais rapidamente possível.

Galeria de identificação Crystal™

As galerias Crystal™ são um método de identificação que utiliza substratos cromogénicos e fluorogénicos, com o objetivo de identificar bactérias de Gram positivo aeróbias. Cada galeria contém 29 substratos bioquímicos ou enzimáticos desidratados, que são rehidratados pela suspensão bacteriana aplicada. Os testes realizados baseiam-se na utilização e degradação de substratos específicos, o que altera a cor de cada poço.

Após incubação durante 4 horas a 37°C, podem ler-se os resultados. Dependendo da cor ou fluorescência presente, é dada uma pontuação a cada poço, de 0, 1, 2, ou 4, o que permite obter no final um número de 10 dígitos. Esse número representa o perfil da bactéria analisada, que é assim identificada.

No laboratório de microbiologia do IPOCFG este método de identificação é sobretudo usado para a identificação de bacilos de Gram positivo, para os quais o sistema Vitek® não possui cartas de identificação, ou quando surgem dúvidas relativamente à identificação de um Gram positivo.

Galerias ATB™ Strep, ATB™ Haemo e ATB™ Ana

O sistema ATB™ baseia-se na presença de cúpulas contendo antibióticos liofilizados, em concentrações conhecidas. É feita uma suspensão bacteriana, que é depois colocada nas cúpulas, e incuba-se a galeria durante 24 horas a 37°C. Após a incubação, a leitura dos resultados é feita no aparelho ATB Expression®, da bioMérieux™. A leitura baseia-se na presença ou ausência de turvação em cada cúpula, o que indica, respetivamente, crescimento bacteriano ou ausência de crescimento. Pode assim concluir-se se a bactéria em estudo é resistente, sensível, ou de sensibilidade intermédia, a cada um dos antibióticos presentes na galeria.

O sistema ATB™ é utilizado no IPOCFG para testes de suscetibilidade de estreptococos dos grupos A, C, F e G de Lancefield, anaeróbios e bactérias do género *Haemophilus* e *Neisseria*, uma vez que não estão disponíveis no sistema Vitek® as cartas necessárias para estas bactérias.

PARTE III: MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

1. COS: gelose Columbia suplementada com 5% de sangue de carneiro

Este meio permite o isolamento de organismos fastidiosos, sendo altamente nutritivo e adaptado para a cultura da maioria das espécies bacterianas. O sangue de ovelha fornece o fator X (heme) e também permite a determinação do tipo de hemólise, um critério básico que permite orientar a identificação do microrganismo presente.

2. PVX: gelose chocolate + PolyViteX

Este é um meio particularmente adequado para a cultura de organismos fastidiosos, como os pertencentes aos géneros *Neisseria*, *Haemophilus* e *Streptococcus pneumoniae*. Esta gelose é enriquecida com os fatores X (heme) e V (NAD).

3. Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol

O meio Sabouraud é utilizado para cultura e isolamento de todos os fungos. A glucose proporciona uma fonte de energia para o desenvolvimento de microrganismos, mas a sua elevada concentração é vantajosa para o desenvolvimento dos fungos, enquanto que a maioria das bactérias não a tolera. O seu baixo pH é também ideal para os fungos, mas não para muitas bactérias. A adição de gentamicina e cloranfenicol previne o crescimento de fungos não patogénicos e de bactérias (tanto de Gram positivo como de Gram negativo). Este meio é normalmente usado para verificar a presença de leveduras, e permanece em incubação a 37°C durante alguns dias.

4. CLED: 'cysteine lactose electrolyte deficient'

É utilizado por rotina para diferenciação, isolamento e quantificação de bactérias na urina, e também para isolamento de bacilos de Gram negativo em qualquer amostra, nomeadamente *Proteus*. As fontes de eletrólitos reduzidas evitam o 'swarming' das espécies

de *Proteus*, o que permite a sua quantificação se estiverem presentes na amostra. É um meio diferencial, pois contém lactose, o que permite diferenciar as colónias fermentadoras.

5. CNA: colistina e ácido nalidíxico

O meio CNA consiste em meio Columbia suplementado com 5% de sangue de carneiro e contendo dois agente antibacterianos: colistina e ácido nalidíxico, razão pela qual se trata de um meio seletivo para bactérias de Gram positivo. A presença do sangue de carneiro permite a visualização dos diferentes tipo de hemólise. Este meio é utilizado em conjunto com o meio CLED para a análise bacteriológica da urina.

6. XLD: desoxicolato-lisina-xilose

O XLD trata-se de um meio utilizado para o isolamento e diferenciação de bactérias patogénicas entéricas de Gram negativo (*Shigella* e *Salmonella*) a partir de amostras de fezes. Utiliza o desoxicolato de sódio como agente seletivo, inibindo assim o crescimento de organismos de Gram positivo. A xilose incorporada no meio permite diferenciar as espécies de *Shigella*, que não fermentam este açúcar (ao contrário da grande maioria dos elementos entéricos). A lisina, por sua vez, permite que o grupo *Salmonella* seja diferenciado de outros elementos não patogénicos, pois sem a presença de lisina as espécies de *Salmonella* fermentariam rapidamente a xilose. Quando as bactérias do género *Salmonella* esgotam a fonte de xilose, utilizam a enzima lisina descarboxilase para fermentar a lisina, o que alcaliniza novamente o meio. Possui ainda tiosulfato de sódio e citrato de amónia férrico, para permitir a visualização do H₂S produzido, que resulta na formação de colónias com centros negros.

7. Cam

Este é um meio seletivo usado para o isolamento de espécies de *Campylobacter* a partir de amostras de fezes. Na sua composição estão incluídos agentes antimicrobianos para que o crescimento da flora fecal normal seja inibido, e também anfotericina B como agente antifúngico. Após inoculação, deve ser incubado a 42°C em atmosfera microaerofílica durante 72 horas. A incubação a temperatura elevada melhora a seletividade do meio, uma vez que inibe a flora normal, enquanto que bactérias do género *Campylobacter*, crescem nestas condições.

8. Meio para hemocultura

São utilizados frascos que contêm um meio líquido rico e um sensor químico que permite detetar aumentos no CO₂ produzido pelos microrganismos em crescimento. Após a inoculação do meio com a amostra de sangue do paciente, o frasco é colocado no equipamento Bactec™, que monitoriza o sensor relativamente ao aumento da fluorescência, que é proporcional à quantidade de CO₂ presente. Se existirem microrganismos na amostra, a formação de CO₂ originada pelo seu crescimento levará a um aumento da fluorescência, o que indica uma leitura positiva.

9. Löwenstein-Jensen (LJ)

Destina-se à cultura de micobactérias, nomeadamente de *Mycobacterium tuberculosis*. É um meio rico, formulado de maneira a suportar o crescimento de micobactérias durante longos períodos de tempo. Contém verde malaquite, que inibe a maioria das bactérias contaminantes. A cultura é feita em tubos de vidro que contêm o meio sólido inclinado e deve ser incubado a 37°C durante seis semanas, no mínimo, sendo vigiado regularmente ao longo desse tempo. O crescimento de *Mycobacterium tuberculosis* caracteriza-se pelo aparecimento de colónias típicas em «couve-flor», de aspeto rugoso e incolores (não cromogéneas).

10. Schaedler

A gelose Schaedler é um meio não seletivo usado para o isolamento de anaeróbios estritos fastidiosos. Contém 5% de sangue de carneiro e fatores de crescimento necessários ao crescimento de certos anaeróbios. Contém também cloreto de sódio, que permite a manutenção do equilíbrio osmótico. Após inoculação, a incubação deve ser feita a 37°C em condições de anaerobiose, durante pelo menos 48 horas.

11. Sistema Mycoline

O Mycoline é um sistema constituído por dois meios inseridos num tubo, e é utilizado para a cultura de fungos filamentosos. Um dos meios consiste em Sabouraud-Gentamicina-Cloranfenicol (seletivo para o isolamento de todas as estirpes de fungos, impedido o crescimento bacteriano); o outro meio consiste em Sabouraud-Cloranfenicol-Actidiona. A cultura em meios com e sem actidiona permite o isolamento seletivo dos dermatófitos: de um modo geral, os dermatófitos crescerão em ambos os meios e os fungos saprófitas apenas crescem no meio sem actidiona.

12. Caldo selenito

Este caldo é um meio de enriquecimento que permite o isolamento de *Salmonella* e de algumas espécies de *Shigella*. O selenito inibe o crescimento de coliformes e de algumas outras espécies bacterianas presentes nas fezes. Os caldos de enriquecimento são especialmente importantes para a deteção de microrganismos patogénicos em amostras fecais, pois estes representam apenas uma pequena percentagem da flora presente.

13. Caldo Schaedler

O caldo Schaedler é usado para o cultivo de microrganismos fastidiosos, tanto aeróbios como anaeróbios. É um caldo altamente nutritivo. O tipo de microrganismo recuperado a partir deste meio depende das condições de incubação do mesmo, pois pode ser incubado em aerobiose, anaerobiose, ou em atmosfera microaerofílica, consoante o que se pretende.

PARTE IV: PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Diariamente, chegam ao laboratório de Microbiologia do IPOCFG diversos tipos de amostras com pedidos de análises microbiológicas, com o objetivo de identificar o ou os microrganismos que possam estar a causar infeção no paciente. Cada tipo de amostra é processada de uma maneira específica, de modo a obter os resultados pretendidos. É necessário um excelente conhecimento da flora microbiana normal que existe nos diversos locais a partir dos quais são recolhidas as amostras, caso contrário poderão sobrevalorizar-se microrganismos que não são o agente patogénico.

Igualmente importante é ter em atenção que a presença de microrganismos da flora normal em número superior ao esperado é um fator a ter em conta ao dar um resultado. Há também que considerar a possibilidade de contaminações, que podem falsear os resultados.

I. Urina

Num indivíduo saudável, o trato urinário é estéril até à parte terminal da uretra. As infeções do trato urinário são as mais comuns na população em geral e também as mais prevalentes em ambiente hospitalar. Podem atingir todas as pessoas independentemente da idade e sexo, embora as mulheres tenham uma maior propensão para tal, devido a razões

fisiológicas e anatómicas. No homem, as causas mais comuns são a hipertrofia da próstata e a obstrução da uretra.

As infecções do trato urinário podem ser classificadas como cistite, referindo-se à infecção da bexiga, ou pielonefrite quando a infecção atinge o trato urinário superior.

Colheita e processamento

A urina recolhida deverá ser a primeira da manhã, pois é mais concentrada. O paciente deve lavar os órgãos genitais com água e sabão e colher depois uma porção do jato médio da urina para um contentor estéril, pois o jato médio tem menor probabilidade de estar contaminado com microrganismos presentes na pele.

Outros métodos de colheita são: a punção suprapúbica, onde a urina é recolhida diretamente da bexiga, o que garante que todas as bactérias presentes na amostra serão relevantes; em pacientes com sonda vesical, deve ser feita a punção da sonda após desinfecção da mesma. A urina nunca deve ser recolhida a partir do saco coletor.

A urina é semeada usando uma ansa estéril calibrada de 10 µL, de modo a permitir a contagem de colónias. Os meios semeados são o CLED e o CNA. Se for pedido ou se houver suspeita da presença de fungos na urina, semeia-se também em Sabouraud. Os meios devem depois ser incubados a 37°C durante 24 horas.

Resultados

Uma urocultura é considerada positiva quando a contagem de colónias for superior a 10^5 unidades formadoras de colónias (UFC) por mililitro. No entanto, não basta observar a contagem de colónias. É importante fazer o exame macroscópico das placas de cultura e determinar quantos tipos diferentes de colónias estão presentes. Três ou mais tipos de colónias diferentes indicam contaminação da amostra, pelo que se deve solicitar nova colheita.

Seguidamente deve examinar-se o aspeto macroscópico das colónias em ambos os meios. Uma comparação entre os meios permite identificar de imediato, por exemplo, a existência de uma bactéria de Gram negativo, pois apenas se observarão colónias no meio CLED. Este meio também permite que se distingam bactérias fermentadoras da lactose de bactérias não fermentadoras. Uma vez estabelecido se a bactéria presente é de Gram negativo ou de Gram positivo (recorrendo, se necessário, a uma coloração de Gram feita a

partir das colónias), pode iniciar-se o processo de identificação e determinação da sua suscetibilidade a antibióticos.

2. Expetoração

As amostras de expetorações são um dos tipos de amostra mais frequente no laboratório de microbiologia, juntamente com as amostras de urina. São frequentes os pedidos para a pesquisa de micobactérias. Para além do exame bacteriológico normal, para que se obtenham resultados fiáveis é essencial efetuar uma colheita correta e processar devidamente a amostra.

Colheita e processamento

A colheita deste tipo de amostras deve ser feita preferencialmente pela manhã, com o paciente em jejum e após higiene oral adequada. A expetoração deve ser obtida a partir de tosse profunda e recolhida para um recipiente estéril. No caso de dificuldade em obter a amostra, pode fazer-se indução através de nebulização salina. Para pesquisa de micobactérias devem colher-se três amostras.

Uma colheita correta é crucial para a obtenção de resultados. Surgem frequentemente amostras contaminadas com secreções orofaríngeas. Antes de iniciar o processamento das amostras é necessário avaliar a qualidade das mesmas através de uma coloração de Gram do produto. O objetivo é visualizar a quantidade de células epiteliais e de leucócitos presentes, pois são dados que permitem concluir se a amostra está contaminada com secreções da orofaringe ou se tem boa qualidade (podendo assim seguir para processamento). Deve observar-se o número de células epiteliais e de leucócitos por campo, na objetiva de 10x. Para a determinação da qualidade da amostra de expetoração são utilizados os critérios de Murray-Washington (Tabela II).

Tabela 11: Critérios de Murray-Washington (Fonte: Koneman et al., 1997).

Grau	Nº de células epiteliais/campo	Nº de leucócitos/campo
Grupo 1	25	10
Grupo 2	25	10-25
Grupo 3	25	25
Grupo 4	10-25	25
Grupo 5	<10	25

O elevado número de células epiteliais nos grupos de 1 a 4 (Figura 4) indica contaminação com secreções da orofaringe. Só as amostras do grupo 5 devem ser consideradas clinicamente relevantes. No entanto, é recomendado que amostras pertencentes ao grupo 4 sejam também aceites (Van Scoy, 1977). Além disso, a ausência de leucócitos em simultâneo com a ausência de células epiteliais não descarta a possibilidade de infecção e este sistema de gradação não deve ser utilizado se há suspeita de infecção pulmonar por fungos ou micobactérias (Koneman et al., 1997).

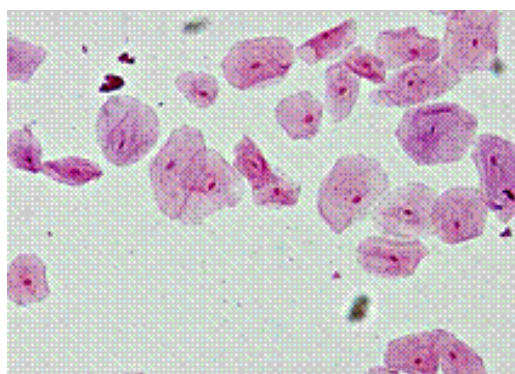


Figura 4: Exemplo de uma amostra de expectoração de pouca qualidade: observa-se um elevado número de células epiteliais e ausência de leucócitos.

(Fonte: http://webmedia.unmc.edu/alliedhealth/CLS/CLS55210/RespiratoryCu10/RespiratoryCu10_frame)

A utilidade da coloração de Gram não se resume à avaliação da amostra; pode igualmente orientar os resultados, pois observa-se que tipo de bactérias estão presentes e quais predominam. As amostras com qualidade devem ser inoculadas nos meios adequados. Por rotina, inoculam-se os meios COS, PVX e Sabouraud. Deve ter-se o cuidado de

selecionar a melhor porção da amostra para efetuar a inoculação como, por exemplo, uma zona purulenta.

Quando é pedida a pesquisa de micobactérias é necessário um processamento adicional. Neste caso, é preparada uma lâmina para a coloração de Ziehl-Neelsen diretamente a partir da amostra (Ziehl-Neelsen direto). Depois é necessário submeter a amostra a uma técnica de homogeneização. Os objetivos desta técnica são: descontaminação da amostra (eliminar bactérias contaminantes, o que se consegue utilizando uma solução bactericida de NaOH 3%), fluidificação (adicionando tampão fosfato e homogeneizando) e concentração (concentrar os bacilos no sedimento por centrifugação). A partir do sedimento obtido prepara-se uma nova lâmina para coloração de Ziehl-Neelsen e inocula-se o meio LJ.

Resultados

Para um resultado correto e fiável é necessário ter em conta vários fatores. A coloração de Gram permite inicialmente verificar se há alguma bactéria predominante na amostra. A visualização e interpretação das placas complementa a coloração de Gram, sendo também necessário verificar quais os tipos de colónias presentes e quais predominam. Deve obter-se uma cultura pura a partir do tipo de colónia considerado dominante e possivelmente responsável pela infeção, para posterior identificação e testes de suscetibilidade.

A pesquisa de micobactérias exige procedimentos adicionais. O primeiro passo é a observação da coloração de Ziehl-Neelsen, tanto da lâmina preparada diretamente a partir do produto como da lâmina preparada após a homogeneização do mesmo. Deve observar-se a totalidade de cada lâmina utilizando para tal a objetiva de 100x. O número de bacilos ácido-álcool resistentes observados deve ser reportado tendo em conta a tabela de contagem (Tabela 12).

Tabela 12: Resultados a reportar após observação da coloração de Ziehl-Neelsen (Fonte: Koneman et al., 1997).

Nº de bacilos observados	Resultado
0	negativo
1-2/300 campos	duvidoso
1-9/100 campos	+1
1-9/10 campos	+2
1-9/campo	+3
>9/campo	+4

No meio LJ, o crescimento de *Mycobacterium tuberculosis* caracteriza-se pelo aparecimento de colónias típicas em «couve-flor», de aspeto rugoso e incolores. Se houver crescimento de colónias no meio, independentemente do seu aspeto, deve fazer-se uma coloração de Gram e uma coloração de Ziehl-Neelsen e fazer repicagem para um meio COS. Se a bactéria presente na colónia repicada aparecer corada no Gram e se crescer no meio COS, pode descartar-se a hipótese de ser uma micobactéria. Contudo, se for confirmada a presença de micobactérias, o meio contendo as colónias suspeitas é enviado para os Hospitais da Universidade de Coimbra aonde a identificação será realizada por métodos moleculares.

3. Sangue

As hemoculturas chegam diariamente ao laboratório de microbiologia, sendo este um exame muito comum no IPOCFG.

Colheita e processamento

Para que haja sucesso na obtenção de resultados a partir de uma hemocultura, é necessário em primeiro lugar que a colheita da amostra seja efetuada corretamente, de modo a evitar qualquer tipo de contaminação. É recomendada a colheita de múltiplas amostras de sangue.

Antes da punção venosa do paciente, deve desinfetar-se o local a puncionar com dois anti-sépticos diferentes: clorexidina e outro (iodopovidona, por exemplo). Isto evita que haja

contaminação com microrganismos presentes à superfície da pele. Seguidamente deve puncionar-se a veia do paciente e recolher cerca de 8-10 mL de sangue, tendo o cuidado de manter a proporção de 1 para 5 de sangue/meio ao inocular o frasco contendo meio adequado para hemocultura. O frasco é colocado, com a maior brevidade possível, no equipamento Bactec™, onde é incubado até que o sistema alerte para a positividade ou negatividade da amostra.

Resultados

Caso a cultura seja positiva, o passo seguinte é fazer uma coloração de Gram e semear um meio COS a partir do frasco. A coloração de Gram também será orientadora da necessidade de inocular outros meios, consoante o que é observado. Após a observação do Gram e das colónias em crescimento na placa, prossegue-se com a identificação e testes de suscetibilidade da bactéria presente.

O sangue é um líquido que, em condições normais, é estéril; a observação de dois ou mais tipos de colónias diferentes numa hemocultura indica contaminação e a colheita deve ser efetuada novamente, com os devidos cuidados de assepsia.

4. Fezes

No IPOCFG, por rotina, numa amostra de fezes faz-se pesquisa de *Salmonella*, *Shigella* e *Campylobacter*. Se for pedido, pode ainda fazer-se pesquisa da toxina de *Clostridium difficile* e exame parasitológico.

Colheita e processamento

Devem recolher-se três amostras, em dias diferentes e isentas de contaminação com urina. Recolhe-se uma quantidade suficiente de produto para um recipiente estéril de boca larga, que deverá depois ser entregue no laboratório o mais rapidamente possível para ser processado.

O produto é semeado em meio XLD e em caldo selenito, que deverão ser incubados a 37°C durante 18-24 horas. O caldo selenito deve ser repicado para meio XLD após a incubação. Também se semeia a amostra em meio Cam, adequado ao isolamento de

Campylobacter, tendo o cuidado de fazer a incubação em atmosfera microaerofílica durante 72 horas; a incubação a 42°C melhora a seletividade do meio, pois inibe o crescimento da flora bacteriana normal.

Resultados

Ambos os meios XLD semeados devem ser observados para verificar a presença de colónias típicas de *Salmonella* ou *Shigella* – colónias de cor rosa avermelhada e, no caso das *Salmonella*, com o centro negro. Relativamente ao meio Cam, deve ser feita uma coloração de Gram a partir das colónias que surjam no meio, para confirmar a presença de *Campylobacter*. Esta bactéria é um bacilo de Gram negativo com uma morfologia muito característica, apresentando-se em forma de S ou em “asa de gaivota”.

Pesquisa da toxina de *Clostridium difficile*

Clostridium difficile é uma bactéria responsável por casos de diarreia severa associada à administração de agentes antibacterianos, pois estes interferem com a flora natural do intestino, permitindo assim a multiplicação excessiva deste microrganismo. É um importante agente patogénico nosocomial. Produz duas toxinas, A e B, que podem causar doença. A toxina A é uma enterotoxina que causa secreção de fluido, danos na mucosa e inflamação interna. A toxina B é uma citotoxina mais potente que a toxina A. Estas toxinas causam danos característicos nas mucosas, com formação de pseudomembranas, levando a uma inflamação severa do cólon denominada de colite pseudomembranosa. Nem todas as estirpes de *Clostridium difficile* produzem ambas as toxinas, e algumas não produzem nenhuma delas, pelo que a deteção de produção da toxina é essencial para o diagnóstico.

Os métodos clássicos de pesquisa são morosos, podendo demorar vários dias até que haja obtenção de resultados, pois é necessário fazer primeiro o isolamento da bactéria em cultura e só depois efetuar testes que confirmem a presença de toxinas. Atualmente, no IPOCFG, a pesquisa da toxina é feita através de métodos moleculares, o que permite a deteção rápida, em menos de uma hora, de ambas as toxinas. É um método muito sensível e específico, mas é bastante caro.

Exame parasitológico

Neste exame, a amostra é observada macro e microscopicamente para a pesquisa de parasitas, ovos, quistos ou larvas. No exame macroscópico das fezes deve ser observada a sua consistência, cor, presença de muco e/ou sangue e presença de parasitas ou fragmentos de parasitas. O exame microscópico compreende duas etapas. Deve ser feito inicialmente um exame direto a partir de um esfregaço fino de fezes frescas. Seguidamente repete-se o exame microscópico após ser feita a concentração da amostra. O método utilizado é o método de Ritchie, pois permite concentrar os elementos parasitológicos no sedimento, que é observado após a adição de lugol.

Começa-se por observar o produto na objetiva de menor ampliação (10x), percorrendo a lâmina para procurar parasitas ou larvas. De seguida, passa-se para a objetiva de 40x, pesquisando por ovos ou quistos que possam estar presentes. É necessária uma observação atenta e exaustiva de todos os campos, tendo em atenção que podem aparecer elementos semelhantes a estruturas parasitárias (grãos de pólen, sementes, fibras vegetais, etc.), e é necessário fazer a distinção destes artefactos para que não se chegue a um falso resultado.

5. Exsudados purulentos

Colheita e processamento

As colheitas de exsudados purulentos podem ser efetuadas de várias maneiras diferentes: o exsudado pode ser recolhido com zaragatoa, colocada em meio de transporte adequado; pode ser recolhido para um recipiente estéril; pode ser recolhido para uma seringa à qual se retira depois a agulha, tapando o orifício; ou para um frasco Portagerm™ (que contém gelose e é inoculado sem que seja retirada a tampa, mantendo assim condições de anaerobiose).

Por rotina, faz-se sempre uma coloração de Gram a partir do produto, e semeiam-se três meios: COS, PVX e Sabouraud. No caso de o exsudado chegar ao laboratório em seringa ou em frasco Portagerm™, a amostra é considerada adequada para pesquisa de anaeróbios e é então semeado o meio adequado (gelose Schaedler em atmosfera de anaerobiose).

A coloração de Gram permite observar a existência de leucócitos e microrganismos na amostra, fornecendo um dado inicial acerca do tipo de bactéria que poderá estar a causar infecção.

Resultados

Após a incubação das placas, observa-se que tipo de colónias estão presentes e em que quantidade. É importante a conjugação dos dados obtidos a partir da coloração de Gram e da observação das colónias. Após a obtenção de culturas puras a partir da ou das colónias consideradas responsáveis pela infecção, passa-se à identificação e testes de suscetibilidade.

6. Exsudados vaginais

Colheita e processamento

Os exsudados vaginais chegam ao laboratório em zaragatoas colocadas em meio de transporte (meio de Stuart). Por rotina, faz-se sempre um exame direto a fresco, uma coloração de Gram e semeia-se o produto nos meios COS, PVX e Sabouraud.

Um dos objetivos do exame direto a fresco é a observação de *Trichomonas vaginalis*, se estiver presente na amostra, pois tem uma morfologia e mobilidade características e dificilmente se visualiza numa coloração de Gram. Também possibilita a observação de células epiteliais, leucócitos, flora vaginal e leveduras. Na coloração de Gram observa-se a morfologia da flora vaginal presente (lactobacilos) e outras bactérias ou leveduras que possam estar presentes, sendo importante observar quais os microrganismos predominantes, o que ajudará na interpretação das placas semeadas.

Resultados

A observação das lâminas preparadas a partir de um exsudado vaginal permite por si só efetuar um diagnóstico presuntivo no caso de existir infecção por *Gardnerella vaginalis*, pois observa-se na coloração de Gram uma morfologia típica, com células epiteliais cobertas por bacilos de Gram variável, denominadas 'clue-cells' (Figura 5). Pode complementar-se este diagnóstico presuntivo com o teste de Whiff, que consiste na adição de KOH 10% ao

exsudado, verificando-se a libertação de um odor desagradável de imediato (cheiro característico a “peixe podre”).

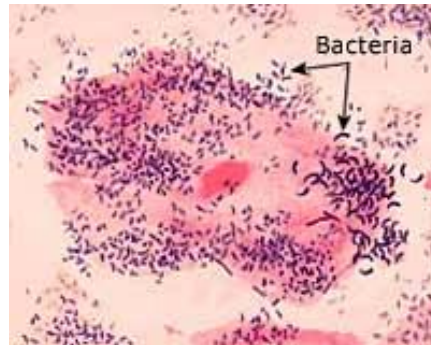


Figura 5: Exemplo de 'clue-cell' num exsudado vaginal.

(Fonte: <http://www.scionpublishing.com>)

Relativamente às placas semeadas, estas devem ser cuidadosamente observadas após incubação. É importante a conjugação dos dados obtidos a partir das observações diretas do exsudado (exame direto a fresco e coloração de Gram) com o exame das colónias nas placas. Após a obtenção de culturas puras a partir da ou das colónias consideradas responsáveis pela infeção, passa-se à identificação e testes de suscetibilidade.

7. Catéteres centrais

A maioria das infeções nosocomiais da corrente sanguínea estão associadas ao uso de catéteres centrais, com taxas de bacteriémia substancialmente mais elevadas do que nos doentes sem catéter (Pina et al., 2006). Quando se suspeita de infeção causada pelo uso de catéter, este pode ser retirado do paciente e enviado para análise microbiológica.

Tendo em conta os pacientes assistidos no IPOCFG, que na sua grande maioria apresentam problemas do foro oncológico, é o CTI (catéter totalmente implantado) o tipo de catéter mais frequentemente analisado no setor de Microbiologia. O CTI é amplamente utilizado durante o tratamento de pacientes com cancro e pode minimizar as complicações decorrentes de terapia intravenosa periférica (Vasques et al., 2009). No entanto, estes catéteres não são isentos de complicações; as infeções relacionadas com o uso de CTI são a complicação mais temida e a sua incidência varia de 3 a 20 por cento (Unamuno et al., 2005).

Colheita e processamento

Após o catéter ser retirado, deve cortar-se a ponta do mesmo, recolhendo assim um fragmento de quatro centímetros que deve ser colocado num recipiente estéril e enviado ao laboratório. Uma vez no laboratório, deve utilizar-se diretamente o catéter para inoculação de um meio COS (o chamado “rodado do catéter”) e seguidamente mergulhar o catéter em caldo Schaedler. A gelose e o caldo (ainda com o catéter no seu interior) devem então ser incubados. Após incubação, o caldo deve ser repicado para meio COS.

Resultados

O resultado da cultura é considerado positivo se surgirem mais de 15 colónias na placa onde se efetuou o rodado do catéter. Devem ser comparadas as duas placas semeadas: a placa semeada diretamente a partir do catéter indica o tipo de bactérias que estão presentes no exterior do mesmo, e a placa semeada a partir do caldo evidencia os microrganismos presentes no interior e no exterior do catéter.

Normalmente surge apenas um tipo de colónia, sendo feita a sua identificação e testes de suscetibilidade.

8. LCR

Colheita e processamento

A colheita de LCR é feita através de punção lombar e o líquido é recolhido para um recipiente estéril e prontamente enviado ao laboratório. O LCR é um líquido normalmente estéril, pelo que qualquer microrganismo encontrado deve ser valorizado.

Por rotina, são feitas colorações de Gram e de Ziehl-Neelsen e um exame direto com contagem de células em câmara de contagem. São semeados os meios COS, PVX e Sabouraud e é inoculado um caldo Schaedler para enriquecimento da amostra, repicado depois para meio sólido.

Resultados

Após a incubação das placas, deve observar-se que colónias estão presentes e em que quantidade. O aparecimento de dois ou mais tipos de colónias diferentes é suspeito e indica

provável contaminação. Caso surja apenas um tipo de colónia e uma cultura de aspeto puro, deve passar-se à identificação e testes de suscetibilidade, pois muito provavelmente estaremos perante o organismo responsável pela infeção.

PARTE V: IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

O processamento de amostras para pesquisa de fungos filamentosos é diferente do processamento de outras amostras recebidas. A análise e identificação são mais morosas e exigem um bom conhecimento da morfologia e características de crescimento do fungo. As amostras que chegam ao setor com indicação para este tipo de pesquisa são fâneros e raspados da pele.

Após a chegada da amostra ao laboratório é feito de imediato um exame direto da mesma, observando ao microscópio uma preparação clareada com NaOH. Se forem visualizadas hifas, esse facto é comunicado ao médico, que pode assim iniciar terapêutica antifúngica no doente.

A amostra é também inoculada no sistema Mycoline e incubada a 25°C. Devem observar-se regularmente os meios, pois um dos fatores que auxilia na identificação do fungo é a velocidade de crescimento, sendo importante saber quando começaram a surgir colónias.

Após o aparecimento de colónias, pode iniciar-se o processo de identificação. É feita a análise macroscópica (cor e aspeto das colónias) e microscópica (estruturas fúngicas) do fungo. A base da identificação dos fungos filamentosos é a observação das estruturas fúngicas numa lâmina preparada a partir de fita adesiva colocada em contacto com a colónia. Pode ser feita uma repicagem para uma placa de Sabouraud, o que permitirá a visualização do reverso da colónia (que não se observa no sistema Mycoline), e a repicagem para mais que uma placa permite inclusivamente testar a que temperaturas cresce o fungo, colocando cada placa a uma temperatura diferente. Existem outras provas úteis para a identificação de fungos, como a urease ou o teste de perfuração do cabelo *in vitro*, por exemplo.

Esta análise é complexa e frequentemente demora várias semanas. Todos os dados obtidos têm de ser conjugados e analisados para se chegar à identificação final da espécie.

PARTEVI: CONTROLO DE QUALIDADE

O setor de Microbiologia do IPOCFG efetua regularmente controlos de qualidade internos e externos. O controlo de qualidade interno consiste na obtenção de estirpes comerciais, que são tratadas como uma amostra utilizando as técnicas de rotina do laboratório. Estas estirpes têm características conhecidas e bem definidas, nomeadamente o perfil de sensibilidade a antimicrobianos, e servem de controlo porque se sabe qual a espécie que deve, no final, ser identificada e que resistências/sensibilidades apresenta. Uma correta identificação e antibiograma da bactéria presente indica que, em princípio, as técnicas, os materiais e os reagentes utilizados são corretos e estão em boas condições. Caso tal não aconteça, há que rever o processamento e tratamento das amostras, pois é imperativo descobrir a fonte do problema e como o solucionar. São também controlados regularmente os meios de cultura e soluções/corantes usados, para verificação da esterilidade dos mesmos.

O controlo externo efetuado é o PNAEQ, do INSA, sendo feitos controlos de bacteriologia geral e de micologia. Relativamente aos controlos de bacteriologia geral, estes chegam quatro vezes por ano ao laboratório e contêm quatro amostras liofilizadas cada um. O controlo de micologia também se realiza quatro vezes por ano, mas consiste em apenas três amostras liofilizadas. Para cada amostra, em ambos os controlos, é fornecida uma breve história clínica. O objetivo é identificar os microrganismos presentes em cada amostra e efetuar também os respetivos testes de suscetibilidade. Os resultados obtidos no laboratório devem ser enviados dentro de um prazo determinado, e posteriormente tem-se acesso ao relatório final aonde é possível verificar o desempenho do laboratório em comparação com outros laboratórios e métodos.

CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO

Este relatório de estágio é o culminar do trabalho que desenvolvi ao longo do mestrado em Análises Clínicas. O balanço final que faço deste mestrado é muito positivo e posso afirmar que excedeu as minhas expectativas. Foram dois anos de muito estudo, durante os quais aprendi imenso todos os dias. A grande maioria das disciplinas e temas com os quais lidei foram uma novidade, pois os meus estudos anteriores ao mestrado tiveram um conteúdo bastante diferente. Nunca senti que isso fosse uma desvantagem, pois adoro aprender e o mundo das análises clínicas fascinou-me desde a primeira aula; nunca tinha tido um contacto tão próximo com a clínica e a fisiologia do corpo humano.

Considero-me privilegiada pela oportunidade que me foi dada de realizar o estágio curricular no SPC do IPO de Coimbra. Fui extremamente bem recebida e continuamente acompanhada. O facto de ser um serviço com um número diário de amostras significativo permitiu-me participar contínua e ativamente na rotina de trabalho, e estou grata pela independência que me permitiram desenvolver em cada setor, pois senti que fazia parte da equipa e consolidei assim novos conhecimentos.

Após este mestrado e respetivo estágio, concluo que as análises clínicas são sem qualquer dúvida a área na qual quero trabalhar no futuro. No laboratório, senti-me útil e realizada, pois participei num processo que ajuda o doente e contribui para a boa prestação de cuidados de saúde. Espero conseguir cumprir este objetivo; sei que tenho empenho, dedicação, e vontade de aprender. O meu percurso só agora começou!

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Coulter LH750 System Help.** Help Version Information 2D1.103272, Copyright Beckman Coulter Inc., 2011.
- **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 Infecção, 2004.
- **HENRY, J.B. – Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods.** 22ª Ed., Philadelphia: Saunders, 2011. 978-1437709742.
- **HOFFBRAND, A.V.; MOSS, P.A.H. – Essential Haematology.** 6ª Ed., Wiley-Blackwell, 2011. 978-1-4051-9890-5.
- **Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide.** Manual part number: 11-11032-01. Copyright BD Biosciences, 2000.
- **KANFER, E.J.; PATH, M.R.C.; NICOL, B.A. – Haemoglobin concentration and erythrocyte sedimentation rate in primary care patients.** J R Soc Med 90 (1997)16-18.
- **KOEPKE, J.A. et al. – Reference and Selected Procedure for ESR Test: Approved Standard.** 4ª Ed., Clinical and Laboratory Standards Institute: Volume 20, Number 27, 2000. 1-56238-424-4.
- **KONEMAN, E. et al. – Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.** 5ª Ed., New York: Lippincott, 1997. 978-0397515295.
- **KRAFTS, K. – Clot or Bleed.** University of Minnesota, School of Medicine: Pathology Student, 2011.
- **PINA, E. et al. – Recomendações para a prevenção da infeção associada aos dispositivos intravasculares.** Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge/Programa Nacional de Controlo de Infecção, 2006.
- **TALPAZ, M. et al. – Dasatinib in Imatinib-Resistant Philadelphia Chromosome–Positive Leukemias.** N Engl J Med 354 (2006) 2531-2541.

- UNAMUNO, M.R. et al. – Uso de catéteres venosos totalmente implantados para nutrição parenteral. Rev Nutr 18, 2 (2005) 261-269.
- VAN SCOY, R.E. – Bacterial sputum cultures: a clinician's viewpoint. Mayo Clin Proc 52 (1977) 39-41.
- VASQUES, C.I.; DOS REIS, P.D.; DE CARVALHO, E.C. – Manejo do catéter venoso totalmente implantado em pacientes oncológicos: revisão integrativa. Acta Paul Enferm 22, 5 (2009) 696-701.
- WATERMAN, C.S. et al. – Improved measurement of erythrocyte volume distribution by aperture-counter signal analysis. Clin Chem 21, 9 (1975) 1201-1211.

Endereços na Internet:

- <http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/cyto2/6/coulter/ss000125.htm> [Acedido a 1 de abril de 2013].
- <http://www.pathology.vcu.edu/education/PathLab/pages/hemostasis/cotests/drvt.html> [Acedido a 2 de maio de 2013].
- http://www.geocities.ws/mtjaved_uaf/system1.jpg [Acedido a 10 de junho de 2013].
- <http://www.bu.edu/histology/p/018010oa.htm> [Acedido a 10 de junho de 2013].
- <http://tidsskriftet.no/image/2012/T-11-0608-01-ENG-No1.jpg> [Acedido a 10 de junho de 2013].
- <http://concerningheart.blogspot.pt/2008/12/low-molecular-weight-heparin.html> [Acedido a 10 de junho de 2013].
- http://webmedia.unmc.edu/alliedhealth/CLS/CLS55210/RespiratoryCu10/RespiratoryCu10_slide0029_image008.gif [Acedido a 21 de junho de 2013].
- [http://www.scionpublishing.com/shop/ProductImages/Clue%20cells,%20suggestive%20of%20bacterial%20vaginosis%20\(10.5\).jpg](http://www.scionpublishing.com/shop/ProductImages/Clue%20cells,%20suggestive%20of%20bacterial%20vaginosis%20(10.5).jpg) [Acedido a 15 de junho de 2013].