



Juliana Cristina Costa Correia

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Dra. Ana Maria Carvalho, pelo Dr. António Fernandes e pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos da Silva e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Juliana Cristina Costa Correia

Relatório de Estágio
Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas,
orientado pela Dr^a Ana Maria Carvalho, pelo Dr. António Fernandes e pela
Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos da Silva e apresentado à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Imagens da Capa:

www.google.pt/search?q=hematologia&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiQIIKwk4rcAhVCCewKHRChBlSQ_AUICigB&biw=1440&bih=804#imgrc=aye7MjMKj4ptlM

https://www.google.pt/search?q=bioquimica+cl%C3%ADnica&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiOp7zgj4rcAhVVKewKHciw_UQ_AUICigB&biw=1440&bih=804#imgrc=hmQPGFFCn3IGQM

https://www.google.pt/search?q=an%C3%AAlises+cl%C3%ADnicas&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjz6-Pzk4rcAhVOI6QKHUubUBRQQ_AUICigB&biw=1440&bih=804#imgrc=fc7E5wb505ptSM

Agradecimentos

Quero deixar um agradecimento sentido e sincero aos meus pais por todo o apoio e força que me dão no caminhar.

Ao meu irmão, que apesar de distante, não deixa de estar presente nos momentos mais difíceis, levando-me sempre a acreditar que consigo ir mais longe.

A todas as pessoas que estiveram comigo nesta etapa e que me apoiaram e ajudaram a ultrapassar momentos mais difíceis.

À Dr^a. Ana Maria Carvalho agradeço a simpatia, apoio, disponibilidade e motivação ao longo do estágio e durante a realização do relatório.

Ao Dr. António Fernandes pela orientação, disponibilidade e ajuda prestada.

Por último, mas não menos importante, agradeço à Professora Doutora Ana Miguel Matos pela ajuda, orientação e disponibilidade demonstrada ao longo da realização do relatório.

Índice

Índice de Esquemas	VII
Índice de Tabelas	VII
Índice de Figuras	VIII
Abreviaturas.....	IX
Resumo	XII=
Abstract	L J
1. INTRODUÇÃO	- 1 -
2. CARACTERIZAÇÃO DOS LABORATÓRIOS DE ESTÁGIO	- 2 -
2.1 - Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Tondela – Viseu, EPE	- 2 -
2.2 - Laboratório Germano de Sousa – Hospital CUF Viseu.....	- 4 -
3. CIRCUITOS DOS PRODUTOS BIOLÓGICOS	- 6 -
3.1- Produtos do Serviço de Patologia Clínica do CHTV	- 6 -
3.2 - Produtos do Laboratório Germano de Sousa	- 7 -
4. CONTROLO DE QUALIDADE	- 8 -
5. LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA.....	- 9 -
6. LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA.....	- 11 -
7. LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA E SEROLOGIA INFECIOSA	- 12 -
7.1 - Equipamentos utilizados no laboratório de Microbiologia.....	- 13 -
7.2 - Controlo de Qualidade Interno (CQI)	- 13 -
7.3 - Exame bacteriológico dos produtos biológicos	- 14 -
7.3.1 - Exame macroscópico do produto.....	- 14 -
7.3.2 - Exame microscópico do produto.....	- 14 -
7.3.3 - Exame cultural	- 15 -
7.4 - Principais produtos biológicos	- 17 -
7.5 - Identificação Bacteriana (ID)	- 25 -
7.6 - Testes de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA)	- 26 -
8. LABORATÓRIO DE HEMATOLOGIA	- 31 -
8.1 - Princípio de Coulter ou Impedância.....	- 31 -
8.2 - Hemograma.....	- 32 -
8.3 - Estudo morfológico das células sanguíneas.....	- 33 -
8.4 - Eritrograma	- 34 -
8.5 - Plaquetas	- 36 -
8.6 - Leucograma.....	- 36 -
8.7 - Interpretação dos parâmetros do hemograma.....	- 36 -

8.8 - Velocidade de Sedimentação	- 38 -
8.9 - Hemostase	- 39 -
8.10 - Pesquisa de Parasitas	- 43 -
9. VALIDAÇÃO E EMISSÃO DE RESULTADOS	- 44 -
10. CONCLUSÃO	- 45 -
II. BIBLIOGRAFIA.....	- 47 -

Índice de Esquemas

Esquema 1 – Equipa de profissionais do Serviço de Patologia Clínica do CHTV.....	2
Esquema 2 – Áreas laboratoriais e funcionais do Serviço Patologia Clínica do CHTV.....	3
Esquema 3 – Circuito dos produtos biológicos na Microbiologia.....	12
Esquema 4 – Representação da cascata de coagulação.....	40

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Provas realizadas pelo Dimension® RxL Max Siemens.....	10
Tabela 2 – Tipo de ensaios e analito efetuados no ADVIA® Centaur XP.....	11
Tabela 3 – CQI realizado no laboratório de Microbiologia.....	13
Tabela 4 – Procedimentos da Coloração de Gram e de Ziehl-Neelsen.....	14
Tabela 5 – Descrição dos meios de cultura	15
Tabela 6 – Tipo de produtos biológicos, meios de cultura, tempos de incubação e colorações.....	16
Tabela 7 – Interpretação das uroculturas.....	18
Tabela 8 – Frascos de hemocultura.....	19
Tabela 9 – Métodos manuais de Identificação Bacteriana.....	25
Tabela 10 – Cartas de ID e TSA utilizadas para os diferentes microrganismos.....	27
Tabela 11 – Provas serológicas de aglutinação.....	30
Tabela 12 – Testes imunocromatográficos.....	30
Tabela 13 – Classificação das anemias de acordo com o VGM e patologias associadas.....	36
Tabela 14 – Classificação das anemias segundo o CHCM e patologias associadas.....	37
Tabela 15 – Alterações dos leucócitos e patologias associadas.....	37
Tabela 16 – Variação do número de plaquetas e possíveis causas.....	38
Tabela 17 – Ensaio, metodologias e equipamentos para avaliar a Hemostase.....	39

Índice de Figuras

Figura 1 – Crescimento de <i>E.coli</i> no meio UriSelect 4 (Microbiologia do CHTV).....	18
Figura 2 – Flora polimorfa (Microbiologia CHTV).....	19
Figura 3 – Crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> em GS (Microbiologia do CHTV).....	20
Figura 4 – Esfregaço de uma expetoração, corado por Gram, não significativo (Microbiologia do CHTV).....	20
Figura 5 – Teste de Optoquina Sensível (Microbiologia do CHTV).....	21
Figura 6 – Crescimento de <i>Acinetobacter spp.</i> no meio MAC (Microbiologia do CHTV).....	21
Figura 7 – Esfregaço de pús, corado por Gram, onde é possível observar leucócitos e bacilos Gram negativos (Microbiologia do CHTV).....	22
Figura 8 – Crescimento de <i>Candida spp.</i> no meio CandiSelect 4 (Microbiologia do CHTV).....	23
Figura 9 – Esfregaço de exsudado vaginal, corado por Gram, onde se observam bacilos Gram positivos (Microbiologia do CHTV).....	23
Figura 10 – Representação do Princípio de Coulter (Retirado de: www.beckmancoulter.com).....	32
Figura 11 – Histograma com distribuição das populações leucocitárias (Hematologia do CHTV).....	33

Abreviaturas

AEQ	Avaliação Externa da Qualidade
AgHbs	Antigénio de Superfície do Vírus da Hepatite B
AL	Anticoagulante Lúpico
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina Aminotransferase
APTT	Tempo de tromboplastina parcial ativada
ASO	Anti-estreptolisina O
AST	Aspartato Aminotransferase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BBL	Sistema de Identificação
BH	Caldo Cérebro (Brain) - Coração (Heart)
CAM	Gelose para <i>Campylobacter</i>
CEA	Antigénio Carcino-embrionário
CHCM	Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
CHTV	Centro Hospitalar Tondela-Viseu
CK	Creatina fosfoquinase
CLED	<i>Cystine Lactose Electrolyte Deficient</i>
CMI	Concentração Mínima Inibitória
COS	Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro
CQI	Controlo de Qualidade Interno
dRVVT	Teste do veneno de víbora de Russell diluído
EA	Éster de acridina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESBL	β - Lactamase de Espectro Alargado
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FSH	Hormona folículo estimulante
FT3	Triiodotironina fração livre

FT4	Tiroxina fração livre
GChoc	Gelose de Chocolate Polyvitex
GN	Caldo para Gram Negativo
GP	Gram Positivo
GS	Gelose de sangue
HCT	Hematócrito
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HGB	Hemoglobina
HMWK	Cininogénio de alto peso molecular
ID	Identificação Bacteriana
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LDH	Lactato Desidrogenase
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LLC	Leucemia Linfóide Crónica
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
MAC	Gelose Mac-Conkey
MH2	Gelose Mueller-Hinton 2
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PSA	Antigénio Específico da Próstata
RBC	Contagem de glóbulos vermelhos
RDW	Variação do tamanho dos eritrócitos
RNA	Ácido ribonucleico
SCT	Teste <i>Silica Clotting Time</i>
SGC	Gelose Sabouraud com Cloranfenicol e Gentamicina
SS	Gelose <i>Salmonella e Shigella</i>
T3	Triiodotironina

TP	Tempo de Protrombina
TSA	Teste de Sensibilidade Microbiana
TSH	Hormona Estimuladora da Tiróide
UFC	Unidade Formadora de Colónias
UK-NEQAS	<i>United kindom National External Quality Assessment Services</i>
VCAT	Meio de Thayer - Martin
VCS	Volume, Condutividade e Dispersão
VGM	Volume Globular Médio
VHC	Vírus Hepatite C
VIH	Vírus Imunodeficiência Humana
VS	Velocidade de Sedimentação
YER	Gelose para <i>Yersinia</i>
γGT	Gama Glutamiltransferase

Resumo

O Mestrado em Análises Clínicas, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), culmina com a realização de um estágio curricular de caráter profissional onde foi possível acompanhar e realizar as atividades desenvolvidas no laboratório.

Realizei o meu estágio no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Tondela - Viseu, EPE nas valências de Hematologia e Microbiologia e no Laboratório Germano de Sousa do Hospital CUF Viseu, as valências de Química Clínica e Imunologia, que termina com a realização deste relatório onde descrevo genericamente as características de cada Serviço e de uma forma mais resumida as áreas de Química Clínica e Imunologia. Por fim e com maior detalhe as valências que me entusiasmaram mais e onde permaneci mais tempo: Microbiologia e Hematologia!

Palavras-chave: Hematologia; Microbiologia; Análises Clínicas; Área laboratorial; Microrganismos.

Abstract

The Master of Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra (FFUC), culminates in the completion of a professional curricular trainee where it was possible to follow and carry out the activities developed in a laboratory.

I completed my internship in the Clinical Pathology Service of the Tondela - Viseu Hospital Center, EPE in the Hematology and Microbiology valences and in the Germano de Sousa Laboratory of the Hospital CUF Viseu in the valencies of Clinical Chemistry and Immunology, which ends with this report where I describe generally the characteristics of each Service and more summarized the areas of Clinical Chemistry and Immunology. Finally, and in more detail the valences that have excited me the most and where I stayed longer: Microbiology and Hematology!

Key words: Hematology; Microbiology; Clinical Analysis; Laboratory Area; Microorganism.

I. INTRODUÇÃO

O aparecimento das Análises Clínicas teve um papel importante no diagnóstico de algumas patologias. Embora seja um método invasivo a colheita de sangue periférico, permite-nos perceber o estado do doente, às vezes sem mais exames complementares. Assim, os exames laboratoriais têm de ser bem interpretados para um bom diagnóstico, monitorização e prognóstico.

Ao longo dos anos têm sido desenvolvidos cada vez mais equipamentos automatizados e com métodos mais sensíveis e precisos, que permitem uma análise dos produtos biológicos de forma mais rápida e menos sujeita a erros humanos.

Existe um vasto leque de produtos biológicos que podem ser analisados tais como: sangue, urina, fezes, líquidos orgânicos, cateteres e muito mais. Estes produtos podem ser analisados em diversas áreas das análises clínicas, desde a Hematologia, Bioquímica, Imunologia, Microbiologia, Virologia, Genética e outras.

Cada vez mais a qualidade com que as amostras são analisadas deve primar num Laboratório de Análises Clínicas, para a obtenção de resultados mais fidedignos. Por isso, são definidas metas cada vez mais exigentes nos serviços prestados. Existindo programas internos e externos que asseguram a qualidade em todo o percurso do produto dentro do Laboratório, desde a sua entrada até à saída do resultado final.

A fim de tornar o estágio curricular mais enriquecedor a nível prático e para uma maior consolidação de conhecimentos adquiridos no Mestrado em Análises Clínicas, optei por realizar o estágio em duas instituições durante cinco meses, onde integrei a rotina das diferentes valências:

- De 2 de janeiro a 30 de março de 2018 no Centro Hospitalar Tondela – Viseu, EPE;
- De 2 de abril a 31 de maio de 2018 no Laboratório Germano de Sousa no Hospital CUF Viseu.

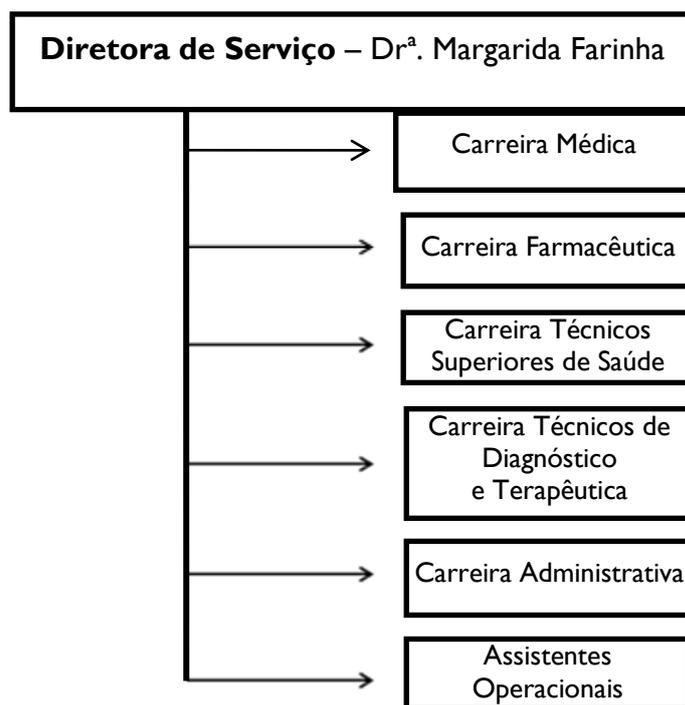
Como proposto no presente relatório, vou explicar resumidamente a Química Clínica e Imunologia do Laboratório Germano de Sousa do Hospital CUF Viseu e de forma aprofundada, a Microbiologia e Hematologia do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Tondela-Viseu, EPE.

2. CARACTERIZAÇÃO DOS LABORATÓRIOS DE ESTÁGIO

2.1 - Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Tondela – Viseu, EPE

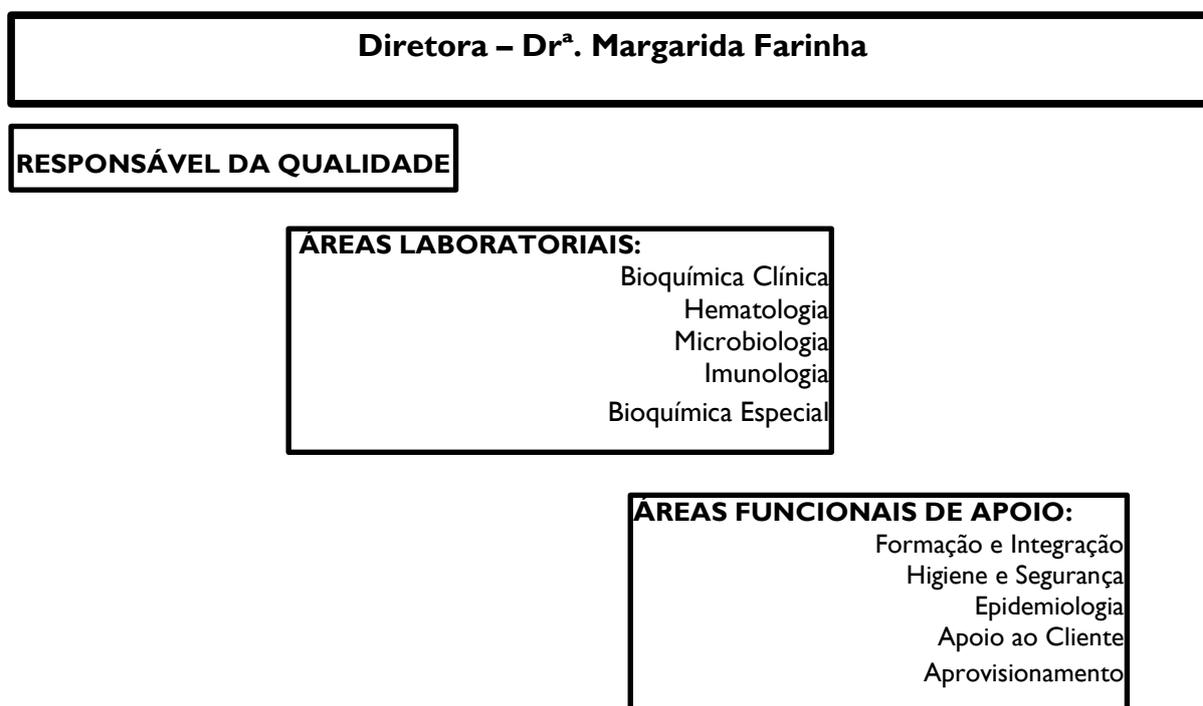
A direção do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Tondela – Viseu (CHTV), EPE fica a cargo da Dr^a. Margarida Farinha, médica especialista em Patologia Clínica. É um dos serviços de ação médica deste Centro Hospitalar, que presta apoio, nas atividades laboratoriais a todos os serviços clínicos das unidades de Tondela e Viseu e aos organismos com quem o Centro Hospitalar estabelece contratos de colaboração.

O laboratório do CHTV, encontra-se dividido em seis áreas laboratoriais: Urgência, Laboratório Central, Bioquímica Especial, Hematologia, Microbiologia e Imunologia. Sem pôr em evidência as dependências hierárquicas e funcionais, nem as funções atribuídas a cada colaborador, dada a limitação de páginas imposta, o esquema I apresenta a vasta equipa de profissionais daquele laboratório.



Esquema I: Equipa de profissionais do Serviço de Patologia Clínica do CHTV.

O laboratório conta ainda com áreas funcionais representadas no esquema 2.



Esquema 2: Áreas laboratoriais e funcionais do Serviço de Patologia Clínica do CHTV.

Junta-se a todas as áreas referidas as salas de colheitas, salas de lavagem de material, sala de reuniões e vestiários.

O Sistema de Gestão de Qualidade afeto ao Serviço é extenso, pelo que com a limitação de páginas não me permite descrever em pormenor. No entanto, o Serviço de Patologia Clínica dispõe do Manual da Qualidade, que apresenta não só o Serviço como a sua organização.

O princípio básico que orienta a política de qualidade é a realização de exames laboratoriais na área da Patologia Clínica com qualidade que exceda a satisfação dos utentes, médicos de forma eficiente e com pouco impacto ambiental. Para isso, o Serviço de Patologia Clínica compromete-se a assumir a qualidade, sistematizar e implementar práticas de gestão, estimular a cultura de competências, garantir uma comunicação eficaz com os utentes/ colaboradores e privilegiar a inovação ao utilizar equipamentos, métodos e reagentes atuais.(1)

2.2 - Laboratório Germano de Sousa – Hospital CUF Viseu

No Laboratório Germano de Sousa integrado no Hospital Cuf Viseu a direção técnica é da responsabilidade do Dr. António Fernandes, Farmacêutico especialista em Análises Clínicas.

O laboratório dá resposta ao serviço de urgência do Hospital bem como à comunidade que efetua análises nos postos de colheitas externos, distribuídos em diferentes locais.

O trabalho laboratorial é efetuado por uma equipa de sete Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica e uma Técnica Superior de Saúde.

O laboratório dispõe de uma sala ampla onde se encontra a área da Bioquímica e da Imunologia. Conta ainda com mais duas áreas laboratoriais, Microbiologia e Hematologia. Em apoio às áreas laboratoriais podemos encontrar ainda uma sala de lavagens, sala de triagem, gabinete de validação, receção e uma sala polivalente.

É de realçar que o Laboratório se compromete a dar uma resposta rápida e eficaz aos utentes que escolhem este laboratório para fazer as suas análises. Tentando satisfazer o utente com a qualidade do serviço prestado. Para tal o Controlo de Qualidade e organização são fundamentais para que isso seja possível.

Fase Pré-analítica

A fase pré-analítica contempla o pedido de análises solicitadas pelo clínico ou pelo utente a título particular. O pedido deve fazer-se acompanhar de informação clínica relevante, para uma melhor orientação aquando da realização do exame.

A marcação da colheita é o segundo passo adotar. Quando é feita a marcação da colheita o utente recebe todas as informações necessárias, tais como o período de jejum, ou como efetuar a colheita de urina caso seja solicitada no pedido de análises e outras informações relevantes. As informações são comunicadas verbalmente ou por escrito.

O atendimento do utente, registo de análises e colheita das amostras deve ser feito no mesmo dia de forma a minimizar erros e possíveis trocas. O material necessário à colheita deve ser preparado atempadamente, para minimizar o tempo de espera do utente.

Após as colheitas, os produtos biológicos devem ser enviados ao laboratório com a maior brevidade possível e o transporte deve ser feito de forma a garantir a viabilidade dos produtos biológicos.

Antes das amostras prosseguirem para o processamento analítico deve ser feita uma triagem, onde se verifica a qualidade dos produtos biológicos, centrifugação, separação em alíquotas. Posto isto, as amostras são distribuídas pelas diferentes áreas laboratoriais.

Relativamente à fase analítica, os produtos biológicos são sujeitos aos procedimentos de análises que leva à emissão do resultado com validação analítica.

E por último a fase pós-analítica, onde os resultados após validação analítica, são enriquecidos através da validação biopatológica, que fornece um resultado completo e posteriormente disponibilizado através de um sistema informático ou por impressão.

A fase analítica e pós-analítica, encontram-se descritas mais à frente.

3. CIRCUITOS DOS PRODUTOS BIOLÓGICOS

3.1- Produtos do Serviço de Patologia Clínica do CHTV

Os produtos biológicos podem ser provenientes do Serviço de Urgência em que os mesmos chegam ao laboratório através de contentores específicos, via vácuo, sendo depois devidamente registados pelo administrativo da secretaria da Urgência, onde é atribuído um número de registo a cada produto. O mesmo método é utilizado para os produtos biológicos provenientes do internamento. Os produtos dos utentes que chegam pelas consultas externas são colhidos ou rececionados nas salas de colheitas do laboratório, por pessoal especializado, Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica, após terem sido registados pelos administrativos do secretariado.

Toda a informação correspondente a um determinado produto, desde que dá entrada no laboratório até à emissão do resultado final, fica acessível a todos aqueles que necessitarem de aceder à informação correspondente ao produto, porque nos meios informáticos existentes nos serviços clínicos há um sistema de “*Intranet*”. Este permite colocar notas sobre o estado do produto, da urgência do mesmo, do local onde vai ocorrer o processamento e permite que todos os acessos à ficha do utente fiquem registados pelo operador que o fez. Posto isto, os produtos são encaminhados para as diferentes áreas laboratoriais, onde são processados com posterior validação.

A validação dos resultados no Serviço de Patologia Clínica do CHTV, EPE, passa por dois tipos de validação. A validação analítica que pressupõe a verificação dos indicadores de bom funcionamento dos equipamentos e o conhecimento dos resultados de Controlo de Qualidade Interno. A validação biopatológica é a segunda validação dos resultados que pretende assegurar a compatibilidade dos resultados do mesmo doente ao longo do tempo, tendo em consideração as variações do estado clínico e terapêutica efetuada.

Todas as áreas do laboratório estão divididas fisicamente e dispõem de equipamentos próprios para o processamento dos diferentes produtos. Em média o Serviço de Patologia Clínica do CHTV recebe 300 produtos biológicos por dia (contando apenas com a rotina), valor que pode variar fundamentalmente em várias alturas do ano.

3.2 - Produtos do Laboratório Germano de Sousa

Os produtos biológicos que chegam ao Laboratório Germano de Sousa provêm do Serviço de Urgência do Hospital em que o laboratório está inserido, através de auxiliares que fazem chegar os produtos biológicos ao laboratório e dos produtos vindos dos postos de colheitas exteriores. O transporte dos produtos que chegam do exterior é feito de forma a garantir a viabilidade dos mesmos.

Os produtos que chegam pelo Serviço de Urgência estão devidamente etiquetados e são processados com a maior brevidade possível, uma vez que o clínico está à espera dos resultados para dar seguimento à terapêutica do doente. Quanto aos produtos rececionados dos postos de colheitas exteriores, apesar de virem etiquetados, antes de serem processados são sujeitos a um processo de triagem. Este é um passo muito importante que tem de ser feito de forma concentrada, pois é nesta fase que se percebe qual o tipo de análises que o utente tem, se há análises para o exterior, se as colheitas foram efetuadas para os tubos corretos e se estão de acordo com as análises pedidas. Só no fim de todo este processo é que os produtos seguem para o processamento.

Chegam ao Laboratório diariamente cerca de 150 produtos biológicos, sendo este valor variável.

4. CONTROLO DE QUALIDADE

Cada vez mais o controlo e o rigor no laboratório devem ter em conta uma melhor qualidade dos serviços prestados.

A qualidade dos resultados na área da saúde deve ser a principal preocupação, nomeadamente a nível laboratorial.

Tanto o Serviço de Patologia Clínica do CHTV como o Laboratório Germano de Sousa asseguram a qualidade dos resultados através da participação em programas de qualidade internos e externos.

a) Controlo de Qualidade Interno (CQI) é diário e realizam-se dois ou três níveis de controlo, níveis normais e patológicos, dependendo dos parâmetros e das técnicas, uma ou várias vezes por dia.

Para a realização do CQI são utilizadas preparações comerciais que podem integrar os “kits” de reagentes ou serem adquiridas isoladamente. Para cada área laboratorial existem especificidades próprias, onde são definidas as regras referentes ao CQI.

b) Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) é efetuada através do ensaio de amostras de controlo nas mesmas condições de ensaio das amostras biológicas. Trata-se de preparações comerciais adquiridas, em que além do produto, a empresa fornecedora se compromete a fazer a avaliação dos resultados obtidos. A avaliação obtida é posteriormente analisada pela Direção em que juntamente com cada responsável da área laboratorial são aplicadas ações corretivas.

O acesso em tempo real aos resultados é possível através do programa *Unity Real Time*, em que se podem ver os resultados de outros utilizadores que usam os mesmos materiais de controlo, reagentes e o mesmo equipamento. Permitindo assim uma comparação simples e rápida.

5. LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA

A grande maioria dos produtos biológicos que chegam ao Laboratório Germano de Sousa, apresentam requisição para a determinação de parâmetros bioquímicos pelo que o grande volume das amostras é concentrado nesta área. É uma área muito automatizada. No entanto, todos os mecanismos bioquímicos são complexos e de grande relação uns com os outros. Daí que, variações a nível de um do metabolismo possa levar à disfunção de outros.

O Laboratório Germano de Sousa tem dois equipamentos automáticos, Dimension® RxL Max Siemens que através de ensaios enzimáticos, cinéticos, fotométricos, turbidimétricos permitem a determinação de diversos parâmetros bioquímicos. Estes equipamentos possuem ainda uma unidade ISE onde são determinadas as espécies iónicas. Apesar dos equipamentos serem iguais, um está mais direccionado para as amostras do Serviço de Urgência que deve estar mais liberto porque a qualquer momento podem entrar amostras urgentes e o outro para as amostras da rotina. Estes equipamentos encontram-se ligados a um servidor que transmite todas as análises que têm de ser realizadas.

Nesta área laboratorial, há uma grande preocupação em manter os equipamentos calibrados e controlados para garantir que os resultados são fidedignos. Acaba por ser uma questão de grande importância, daí que as amostras sejam apenas colocadas no equipamento quando está apto.

As amostras analisadas podem ser soro ou urina.

Relativamente às amostras de urina, estas podem chegar ao laboratório em pequenos recipientes (amostras ocasionais) ou contentores de 24 horas. As amostras ocasionais, tal como as amostras de urina de 24 horas, são separadas nos postos exteriores e quando chegam ao laboratório são centrifugadas a 3000rpm durante 5 minutos.

Os principais parâmetros analisados pertencem a diferentes metabolismos e funções: metabolismo dos glúcidos, metabolismo proteico, metabolismo mineral e ósseo, função hepática, função renal, função pancreática, função cardíaca (Tabela I).

Tabela I: Provas realizadas pelo Dimension® RxL Max Siemens.

Função/Metabolismo	Analito	Técnica
Metabolismo dos glúcidos	- Glicose	Ensaio UV enzimático
Metabolismo Proteico	- Proteínas séricas totais - Proteínas Urinárias - Albumina	Ensaio de cor fotométrico
	- PCR	Imunoensaio turbidimétrico
Metabolismo Mineral e Ósseo	- Cálcio total - Magnésio	Ensaio de cor fotométrico
	- Fosfato (Fósforo inorgânico)	Ensaio UV fotométrico
Metabolismo Lipídico	- Colesterol - Triglicerídeos - Colesterol HDL	Ensaio de cor enzimático
	- Colesterol LDL	Cálculo através da fórmula Friedwald
Metabolismo do Ferro	- Ferro	Ensaio de cor fotométrico
	- Transferrina	Imunoensaio turbidimétrico
Função renal	- Ureia	Ensaio UV cinético
	- Creatinina	Ensaio de cor cinético
	- Ácido úrico	Ensaio de cor enzimático
	- Microalbuminúria	Imunoensaio turbidimétrico
Função hepática	- AST - ALT	Ensaio UV cinético
	- γ gt - ALP	Ensaio de cor cinético
	- Bilirrubina total - Bilirrubina direta	Ensaio de cor fotométrico
Função pancreática	- Amilase	Ensaio de cor cinético
Função cardíaca	- CK - LDH	Ensaio UV cinético
Doenças auto-imunes	- Fator reumatoide	Imunoensaio turbidimétrico
Doenças infecciosas	- ASO	Imunoensaio turbidimétrico
Eletrólitos	- Sódio - Potássio - Cloreto	Potenciometria com elétrodos seletivos de iões.

6. LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA

No Laboratório Germano de Sousa, existe uma área laboratorial de Imunologia, onde se realizam e determinam alguns parâmetros como: marcadores tumorais, avaliação da função tiróidea, hormonas de reprodução e marcadores de Serologia Infeciosa.

Existe um equipamento automatizado o ADVIA® Centaur XP que utiliza quimioluminescência como metodologia de análise. Com essa metodologia, associada ao imunoensaio, a luz emitida é proporcional à quantidade do analito presente na amostra. O marcador de quimioluminescência utilizado pelo ADVIA® Centaur XP é o Éster de Acridina (EA).(2)

O equipamento utiliza diferentes ensaios para deteção de antigénios assim como anticorpos: Imunoensaio do tipo Sandwich; Imunoensaio Competitivo. Recorrendo a esses ensaios são determinados alguns analitos, que estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Tipo de ensaios e analito efetuados no ADVIA® Centaur XP.

Tipo de ensaio	Analito
COMPETITIVO	T3 FT4 FT3 Vitamina B12
SANDWICH	PSA PSA Livre TSH AgHbs FSH CEA CA 125 Anti-Hbs Ferritina Anti-HCV HIV

De referir que o equipamento é sujeito a calibrações e controlos. No que diz respeito às calibrações, são realizadas aquando de mudança de lote dos reagentes ou são pedidas periodicamente pelo equipamento. O controlo é feito diariamente, mas não em todos os parâmetros. Existe um mapa onde estão assinalados todos os controlos a fazer em cada dia. Para além dos controlos assinalados ficam sujeitos a controlo os parâmetros que sofrerem calibração.

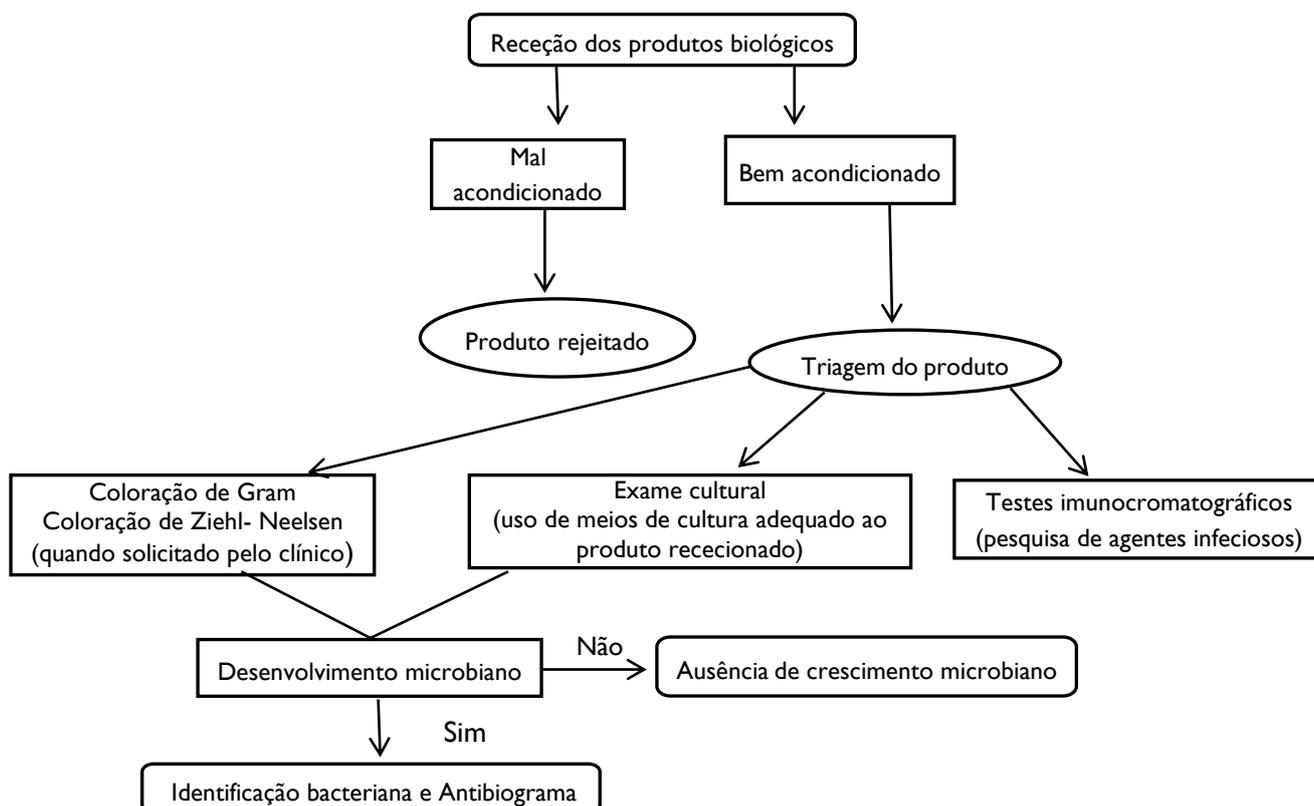
7. LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA E SEROLOGIA INFECIOSA

O laboratório de Microbiologia Clínica tem responsabilidades que vão desde a caracterização do agente causador da infecção no doente até à deteção de surtos globais de doenças. Esses processos são cada vez mais complexos. Assim todo o laboratório é obrigado a melhorar continuamente a qualidade.(3)

A minha passagem pelo laboratório de Microbiologia do CHTV, teve duração de um mês o que permitiu abranger todas as áreas. O laboratório é constituído por uma sala ampla onde se encontram equipamentos automáticos e semi-automáticos. Neste laboratório realiza-se a análise bacteriológica, micológica, parasitológica, micobacteriológica bem como a serologia infecciosa de diversos produtos biológicos. Como é de esperar a Microbiologia envolve um trabalho sobretudo manual, daí a diferença em número de equipamentos existentes quando comparado com outras áreas.

Como o meu período de estágio nesta secção foi apenas de um mês, debruicei-me mais na bacteriologia para descrever no meu relatório.

Um dos principais objetivos da Bacteriologia é a identificação do agente responsável pela infecção e determinação da sua sensibilidade aos antibióticos para que o clínico possa direcionar ou ajustar a terapêutica. Assim no esquema 3 tento explicar qual o circuito dos produtos biológicos desde a receção até ao resultado final.



Esquema 3: Circuito dos produtos biológicos na Microbiologia.

Durante o tempo que permaneci no laboratório de Microbiologia, tive oportunidade de integrar na rotina do mesmo, participando assim na verificação da recepção dos produtos biológicos e na observação macroscópica dos mesmos. Caso estes não estivessem em conformidade para o processamento da análise requisitada pelo clínico era solicitada nova colheita, manuseei alguns dos equipamentos, bem como passagem de controles e manutenções diárias.

Fui adquirindo capacidade para decidir e selecionar os testes mais adequados a executar em função do produto, observação ao microscópio dos exames diretos e esfregaços, execução de diferentes metodologias no que diz respeito a identificação e testes de suscetibilidade aos antimicrobianos em função da estirpe isolada nos meios de cultura.

7.1 - Equipamentos utilizados no laboratório de Microbiologia

Analísadores automáticos e semi-automáticos:

1. BD Bactect™ – sistema automático para a detecção de microrganismos. Estes metabolizam o meio de cultura e libertam CO₂ para o meio. Contêm fotodetetores que medem a fluorescência correspondente à quantidade de CO₂ libertada.
2. iQ 200® da Iris Diagnostics – analisador automático para Análise Sumária de urina em que numa das partes faz a análise química e noutra a avaliação dos elementos figurados na urina através dum microscópio acoplado a uma câmara digital que permite registar mais de 500 campos.
3. Vitek® 2 Compact da Biomérieux – analisador automático para a identificação e antibiograma.(4)
4. MiraStainer® – para colorações de esfregaços.

7.2 - Controlo de Qualidade Interno (CQI)

Em qualquer laboratório deve ser feito o CQI (Tabela 3) para uma melhor garantia dos resultados obtidos.

Tabela 3: CQI realizado no laboratório de Microbiologia.(1)

Controlo de esterilidade		Controlo de Identificação e TSA		
Meios de cultura	Solução do Vitek	Grupo 1	Grupo 2	Métodos manuais
Mudança de lote ou mensalmente, colocam-se os meios a incubar a 37°C/24h.	Faz-se semanalmente uma cultura da solução em gelose de chocolate, que incuba durante 48h.	Estirpes ACTT: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> *	Estirpes ACTT: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> *	Mensalmente fazem-se identificação e TSA manual (método Kirby-Bauer) das estirpes contidas no grupo 1 e 2.

* Cada um dos grupos é ensaiado alternadamente de modo que as estirpes sejam testadas de mês a mês, como se fossem produtos biológicos.

Relativamente à Avaliação Externa da Qualidade (AEQ), o Serviço da Patologia Clínica colabora com o *United kindom National External Quality Assessment Services (UK-NEKAS)* que enviam mensalmente amostras para serem processadas como qualquer outra amostra, para diferentes parâmetros e determinações.(1)

7.3 - Exame bacteriológico dos produtos biológicos

7.3.1 - Exame macroscópico do produto

Antes do processamento dos produtos biológicos, estes devem ser verificados se foram realizados corretamente e para os recipientes corretos.

Deve ter-se em atenção se a requisição e o produto são do mesmo doente. Em alguns produtos nomeadamente o LCR, deve também ser registado o volume.

Deve ser verificado se existe quantidade suficiente de produto para análise.

7.3.2 - Exame microscópico do produto

- Coloração de Gram e Ziehl- Neelsen

Após a execução do esfregaço a partir do produto deve secar. De seguida é fixado à chama. A coloração de Gram e de Ziehl- Neelsen (Tabela 4), são próprias para esfregaços de produtos biológicos e culturas. Ambas são realizadas pelo equipamento MiraStainer[®].

Tabela 4: Procedimento da Coloração de Gram e de Ziehl-Neelsen.

Coloração de Gram (5)	
Corantes	Tempo (segundos)
Violeta de Cristal	60'
Lavagem com água	30'
Soluto de Lugol	30'
Álcool-acetona	15'
Lavagem com água	30'
Fucsina diluída	60'
Lavagem com água	30'
Secagem	180'

Coloração Ziehl-Neelsen (5)	
Corantes	Tempo (segundos)
Fucsina concentrada	600'
Lavagem com água	30'
Álcool ácido	120'
Lavagem com água	30'
Azul de metileno	60'
Lavagem com água	30'
Secagem	180'

No fim de realizada a coloração Gram, as lâminas são observadas com a objetiva de imersão de 100X. Podemos diferenciar os microrganismos Gram positivos que coram de roxo dos microrganismos Gram negativos que coram de rosa. É ainda possível semi-quantificar (raros,

alguns ou muitos), diferenciar (cocos, bacilos, cocobacilos, estafilococos, estreptococos, Gram negativos e positivos, leveduras) e analisar a morfologia dos leucócitos (mono e polimorfonucleares).

7.3.3 - Exame cultural

O exame cultural dos produtos biológicos é realizado tirando partido dos principais meios de cultura cuja descrição é apresentada na Tabela 5. Os produtos biológicos para além inoculados em meios de cultura corretos e adequados à origem da amostra e ao microrganismo a pesquisar, têm também de ser incubados nas condições corretas (Tabela 6).

Tabela 5: Descrição dos meios de cultura.(6)

Meios	Descrição
Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (GS)	Meio nutritivo muito rico, permite crescimento das espécies bacterianas. Devido ao sangue de carneiro permite a visualização da hemólise.
Gelose Mac Conkey (MAC)	Meio que permite isolamento seletivo e diferencial para as enterobactérias. Violeta de cristal – evidencia a fermentação da lactose pela viragem do vermelho neutro.
Gelose de Chocolate (GChoc)	Meio seletivo para isolamento de bactérias fastidiosas, como <i>Neisseria spp.</i> e <i>Haemophilus spp.</i>
Gelose Sabourand Gentamicina Cloranfenicol (SGC)	Meio de isolamento para leveduras e fungos filamentosos. Peptonas e glucose – Desenvolvimento das estirpes fúngicas Gentamicina – inibe bactérias Gram(-) e Gram (+) Cloranfenicol – melhora a seletividade de algumas espécies, por vezes resistentes à gentamicina.
Gelose SS (SS)	Meio de isolamento seletivo e diferencial destinado às espécies de <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i> a partir das fezes.
Gelose Yersinia (YER)	Meio de isolamento seletivo destinado à deteção de <i>Yersinia spp.</i> Manitol e vermelho neutro – permitem diferenciação da <i>Yersinia spp</i> Colato, desoxicolato, cristal violeta, Irgasan e de antibióticos impede crescimento de outras bactérias.
Gelose Campyloset (CAM)	Meio seletivo para isolamento do <i>Campylobacter</i> intestinais.
Gelose CLED	Para isolamento de microrganismos urinários. Colónias amarelas – fermentadores de lactose Colónias esverdeadas, azuis ou incolores – não fermentadores.
Gelose Mueller-Hinton 2 (MH2)	Meio que permite o crescimento de bactérias não exigentes e é utilizado na realização de antibiogramas por difusão.
Caldo Cérebro – Coração (BH)	Permite o crescimento de microrganismos mais exigentes.
Gelose VCAT	Gelose Chocolate PolyviteX descrita por Thayer e Martin. Meio seletivo para isolamento de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Neisseria meningitidis</i> . Contém fator X (hemina) e V (NAD). Tem uma composição em antibióticos (VCAT= Vancomicina, Colistina, Anfotericina B, Trimetoprim – sulfametoxazole), que inibe maior parte das bactérias e leveduras.
Uri Select 4	Isolamento e contagem de bactérias urinárias e identificação direta de <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Proteus mirabilis</i> .

Tabela 5: Descrição dos meios de cultura.(6) f77 cbh}bi U -ck

Meio Granada	Para pesquisa do <i>Streptococcus</i> grupo B (<i>Streptococcus agalactiae</i>). Contém cristal violeta para inibir os estafilococos.
Caldo GN	Utilizado para enriquecimento seletivo de Gram negativos.
CandiSelect 4	Meio cromogénio e seletivo para leveduras. Permite a identificação da <i>Candida albicans</i> e identificação presuntiva de outras espécies patogénicas <i>C. Glabrata</i> , <i>C. Tropicalis</i> e <i>C. Krusei</i> .

Tabela 6: Tipo de produtos biológicos, meios de cultura, tempos de incubação e colorações.

Produtos	Meios		Estufa		Lâminas		
	Sólidos	Líquidos	37°C Atm com 5% CO ₂	37°C Atm O ₂	Gram	Ziehl	Fresco
Exsudado purulento	GChoc + GS + MAC	BH	GChoc + GS	MAC + BH	✓	(se pedido)	
Líquidos de cavidades serosas	GChoc + GS + MAC	BH	GChoc + GS	MAC + BH	✓	(se pedido)	
Hemocultura	GChoc + GS		GChoc + GS		✓		
Exsudado vaginal/uretral	GChoc + GS + MAC + SGC + VCA		GChoc + GS	MAC + SGC	✓		✓
Exsudado de Orofaringe	GChoc		GChoc				
Bílis	GChoc + GS + MAC			MAC			
Secreções respiratórias	GChoc + GS + MAC		GChoc + GS	MAC	✓	✓	
Fezes	SS + YER + CAM	GN		SS + GN + CAM + YER			✓
Fragmentos de tecido	GChoc + GS + MAC	BH	GChoc + GS	MAC	✓		
Córnea	GChoc + GS		GChoc + GS		✓		
Catéter	GS		GS		✓		
Urina	Uri Select 4			Uri Select 4			
Pesquisa <i>Streptococcus agalactiae</i>	Granada			Granada			
Líquido cefalorraquidiano (LCR)	GChoc+ GS	BH	GChoc + GS		✓	(se pedido)	

Após a seleção dos meios e técnicas de cultura adequadas para cada produto, devem ser selecionadas as condições de incubação. As culturas são incubadas a 35-37°C, numa atmosfera com oxigénio no caso de MAC e UriSelect 4 ou numa atmosfera com 5-7% de CO₂ a GChoc e GS, durante 18 a 24 horas. Há microrganismos mais fastidiosos cujo crescimento é lento, então nestes casos a incubação pode ser de 72 horas. Os meios líquidos de enriquecimento (BH), incubam 48 horas, ao fim do qual é feita a repicagem para os meios de cultura GS e GChoc e o BH é eliminado.

No fim do tempo de incubação estabelecido para cada meio, as culturas são retiradas da estufa e observadas as colónias quanto às suas características, tais como: - tamanho, forma, cor, superfície, margens, opacidade/brilho, cheiro, swarming, produção de H₂S e alterações dos meios de cultura. Estas características fornecem ao profissional uma informação preliminar, que ajuda na decisão quanto à identificação e antibiograma.

7.4 - Principais produtos biológicos

→ Urina

A análise de urina divide-se em duas partes, a análise sumária de urina e análise bacteriológica.

A análise sumária e a observação do sedimento urinário no Serviço de Patologia Clínica são realizadas no iQ 200[®] da Iris Diagnostics, em que através de tiras de reagente é possível obter resultados para a densidade, pH, glicose, proteínas, corpos cetónicos, leucócitos, eritrócitos, nitritos, bilirrubina, urobilinogénio.

O sedimento urinário permite a observação dos elementos figurados que estão presentes na urina. Esta análise é feita num analisador automático iQ 200[®] da Iris Diagnostics, que tem um microscópio incorporado e faz o registo de mais de 500 campos. Nas imagens captadas temos uma classificação automática dos elementos figurados, tais como eritrócitos, leucócitos, células epiteliais, bactérias, leveduras, cristais, cilindros e muco. Aquando da validação o patologista ou farmacêutico pode ter necessidade de confirmar através da visualização ao microscópio. Durante o estágio e para melhor entender os resultados obtidos pelo equipamento a nível do sedimento urinário foi possível fazer a observação de uma série de amostras de urina ao microscópio entre lâmina e lamela.

O exame bacteriológico da urina - urocultura - tem início com a homogeneização do produto e com a seleção adequada do meio. No laboratório de Microbiologia utiliza-se Uri Select 4 que por um lado permite o isolamento e contagem dos agentes patogénicos do

trato urinário. Por outro, faz uma identificação direta de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Proteus mirabilis* visto ser um meio cromogéneo.

A cultura é feita com uma ansa de 1 µL para urinas colhidas por jato intermédio ou com ansa de 10 µL se a urina resultar de uma colheita por punção vesical. (1)

As culturas incubam a 37°C, durante 18-24 horas. No entanto, pode ser prolongado para 48 horas, se existir um crescimento deficiente das colónias ao fim de 18-24 horas de incubação em doentes com piúria, em pedidos de pesquisa fungos, se a urina for de um recém-nascido, urina colhida por punção supra-púbica, cateterismos ou de doentes imunodeprimidos.

A observação das uroculturas deve ter por base a visualização ou não de crescimento de microrganismos, uma vez que a interpretação é feita com essa avaliação (Tabela 7).

Tabela 7: Interpretação das uroculturas.(1)

Observação	Interpretação
Ausência de crescimento microbiano	Urocultura negativa
$\leq 10^3$ UFC/mL cultivado com ansa de 1 µL	Urocultura não significativa
$\leq 10^2$ UFC/mL cultivado com ansa de 10 µL	Flora comensal sem significado clínico
Três ou mais microrganismos uropatogénicos	Flora polimorfa (Figura 2)
$\geq 10^5$ UFC/mL $\geq 10^4$ UFC/ mL e $\leq 10^5$ UFC/mL por um só microrganismo. Na presença de disúria ou sintomas de infeção do trato urinário $\geq 10^4$ UFC/ mL em crianças ou doentes cateterizados que apresentam o mesmo microrganismo. Em mais do que uma amostra Qualquer desenvolvimento em punções vesicais	Urocultura significativa

Se as uroculturas forem negativas ou não significativas, o procedimento termina e o resultado é inserido na ficha do doente. Quando as uroculturas têm interpretação significativa seguem para a identificação e TSA, à exceção da *E. coli* em que só é feito o TSA, uma vez que a identificação já nos é dada pelo meio de cultura Uri Select 4.



Figura 1: Crescimento de *E. coli* no meio UriSelect 4 (Microbiologia do CHTV).

- ✓ Os agentes etiológicos mais frequentes são as *Enterobacteriaceae* com grande destaque para a *Escherichia coli* (Figura 1) seguida de outros agentes, tais como: *Pseudomonas spp*, *Acinetobacter spp*, *Enterococcus spp*, *Staphylococcus spp* e fungos leveduriformes.

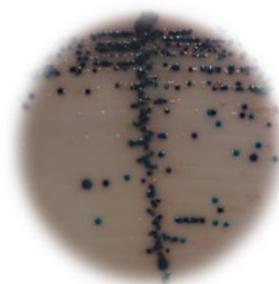


Figura 2: Flora polimorfa (Microbiologia do CHTV).

→ Hemocultura

As hemoculturas chegam ao laboratório de Microbiologia em frascos próprios para transporte de amostras de sangue. Na Tabela 8, estão descritos quais os diferentes frascos usados para as diferentes pesquisas de microrganismos e os respectivos tempos de incubação.

Tabela 8: Frascos de hemocultura

Frasco de cultura	Microrganismo	Incubação	Frascos utilizados
1. BD BACTEC™ Peds Plus/F	Aeróbios	5 Dias	
2. BD BACTEC™ Lytic/10 Anaerobic/F	Anaeróbios	5 Dias	
3. BD BACTEC™ Mycosis IC/F	Fungos	13 Dias	
4. BD BACTEC™ plus+ Aerobic/F	Aeróbios	5 Dias	
5. BD BACTEC™ Myco/F-Lytic	Micobactérias	42 Dias	

Os frascos mantêm-se no equipamento BD Bactect™, durante os tempos determinados para cada um. No fim dos respectivos tempos de incubação, os frascos que não positivarem são dados como negativos e nos resultados é indicado “Ausência de crescimento microbiano”. No entanto, se positivarem procede-se do seguinte modo:

- Para os positivos aeróbios, faz-se a repicagem a partir do frasco positivo para GS e GChoc que incubam a 37°C com 5% de CO₂.
- Para os positivos anaeróbios, a inoculação é feita segundo procedimento próprio, com o qual não contactei.

- Quando os frascos BD BACTEC™ Mycosis IC/F positivam dentro do tempo estabelecido de incubação, deve ser feita a repicagem a partir do frasco para o meio de Sabourand com gentamicina e cloranfenicol (SGC) e incuba a 37°C.
- Nos frascos positivos para micobactérias, realiza-se um esfregaço a partir do frasco e cora-se pela coloração de Ziehl-Neelsen, com objetivo de ver os bacilos ácido-álcool resistentes.

É feito ainda um esfregaço a partir do frasco que positivou e corado pela coloração de Gram ou Ziehl-Neelsen conforme a proveniência da amostra. Com a visualização microscópica do esfregaço é possível ficar com uma ideia do agente causal da infecção.

A valorização dos resultados é feita de acordo com o contexto clínico, estado imunitário, tipo de agente causal e resultado da segunda hemocultura. Os microrganismos potencialmente patogênicos devem ser identificados e realizado o respetivo antibiograma.(1)

Na presença de *Staphylococcus* faz-se o Slidex® de Staph., que permite identificar *Staphylococcus aureus* (Figura 3) a partir do meio de cultura. Caso seja negativo esse teste e se o outro frasco de hemocultura par estiver negativo, não é realizado mais nenhum processo, porque nesta situação o microrganismo presente é resultante duma contaminação, dando apenas indicação ao clínico da presença de *Staphylococcus* Coagulase Negativa.

- ✓ Microrganismos mais frequentes: *Staphylococcus spp.*,
Streptococcus spp., *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*.



Figura 3: Crescimento de *Staphylococcus aureus* em GS (Microbiologia do CHTV).

➔ **Secreções respiratórias do trato respiratório inferior (expetoração, secreções brônquicas, aspirado brônquico, lavado bronco-alveolar)**

Nas expetorações, secreções brônquicas, aspirado brônquico a observação do Gram é fundamental para avaliar a qualidade do produto. Este só é aceite e cultivado quando com a observação de cerca de 10 campos com objetiva de 10X são observados 25 neutrófilos e cerca de 10 células epiteliais/campo - produto para análise. Quando o número de células epiteliais por campo é superior a 25 - produto rejeitado (Figura 4).

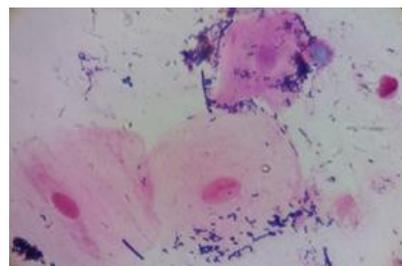


Figura 4: Esfregaço de expetoração, corado por Gram, não significativo (Microbiologia do CHTV).

Pode ainda ser efetuada a coloração de Ziehl-Neelsen para pesquisa de Bacilos ácido-álcool resistentes nas amostras em que é solicitado.

Para os produtos biológicos obtidos por métodos invasivos (broncofibroscopia) é efetuado sempre o exame cultural.

Para tal, são escolhidos preferencialmente três meios, GS, GChoc e MAC. Os primeiros meios são incubados a 37°C com 5% de CO₂ e o MAC a 37°C, durante 24 horas.

A valorização dos agentes patológicos baseia-se na qualidade da amostra, predomínio da população microbiana e informação clínica. Um dos agentes patológicos mais frequentes é o *Streptococcus pneumoniae*. Com o teste da Optoquina é possível chegar a um diagnóstico presuntivo desse microrganismo. Se o teste for Sensível (S) (Figura 5) estamos perante um *Streptococcus pneumoniae*, se houver crescimento à volta do disco é Resistente (R) e não se trata de *Streptococcus pneumoniae*.

- ✓ Outros microrganismos mais frequentes: *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus spp* e *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp*, *Acinetobacter spp*. (Figura 6).

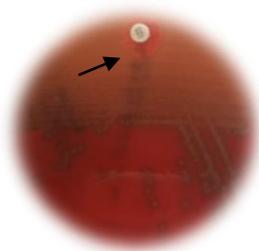


Figura 5: Teste da Optoquina Sensível (Microbiologia do CHTV).



Figura 6: Crescimento *Acinetobacter spp*. (Microbiologia do CHTV).

→ Fezes

O intestino e o cólon são zonas do trato gastrointestinal onde prevalece uma vasta flora microbiana. Apesar de algumas barreiras protetoras que o organismo possui, as perturbações gastrointestinais têm grande morbidade no caso das crianças e idosos. Há um conjunto de fatores como sintomas clínicos ou tipo de diarreia que podem orientar a pesquisa do agente causal da infeção.

A coprocultura, isto é, o exame cultural para a pesquisa dos agentes patogénicos nas fezes é orientada de maneira diferente consoante a idade da pessoa.

Amostras de crianças com menos de 2 anos são cultivadas em GN, SS, YER, CAM, amostras de fezes de crianças com mais de dois anos e de adultos são cultivadas em GN e SS. No entanto, sempre que o clínico solicite o pedido de cultura para a *Yersinia spp* ou *Campylobacter spp* é efetuada independentemente da idade.(1)

Após inoculação nos meios de GN, SS e MAC estes vão incubar a 37°C, durante 24 horas. O meio YER, incuba 48 horas a 25°C e o meio CAM a incubação é feita em atmosfera de microaerofilia, durante 5 dias.

A não observação de colônias enteropatogénicas classifica a coprocultura com “Desenvolvimento de flora comensal, sem significado clínico”. As culturas morfológicamente compatíveis com bactérias enteropatogénicas continuam com procedimentos de identificação.

- ✓ Microrganismos mais frequentes: *Salmonella spp*, *Yersinia spp* e *Campylobacter spp*.

➔ Exsudados purulentos

Os exsudados purulentos que provêm de feridas, abscessos, fístulas colhidos com zaragatoa são inoculados em GS, GChoc, MAC e BH.

O exame direto é efetuado com coloração de Gram (Figura 7).

Caso seja solicitado pelo clínico o exame micológico tem de se acrescentar o meio seletivo SGC.

A incubação da GS e GChoc é feita a 37°C com 5% de CO₂. O MAC e BH são incubados a 37°C. SGC incuba a 30°C/ 24 horas.

Tem de ser dada especial atenção à proveniência da amostra para uma melhor interpretação dos microrganismos isolados.

- ✓ Microrganismos mais frequentes: *Streptococcus spp*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus Coagulase Negativa*, *Enterococcus spp*. e Bacilos Gram Negativos.

➔ Exsudados urogenitais (vaginal e uretral)

Os exsudados vaginais devem ser colhidos em zaragatoas e transportados em meio adequado.

Os exsudados são inoculados em GS e VCAT (meio seletivo para as bactérias do género *Neisseria*) (6) que incubam a 37°C com 5% de CO₂. São inoculados ainda no meio CandiSelect 4 (Figura 8), que permite a identificação direta da *Candida albicans* e presuntiva de outras espécies de *Candida spp*. Este meio é incubado a 30°C, durante 24 horas. A visualização do Gram (Figura 9) deve incidir na contagem dos leucócitos e na morfologia microbiana. Deve ainda ser realizado o exame direto para pesquisa de *Trichomonas vaginalis*.

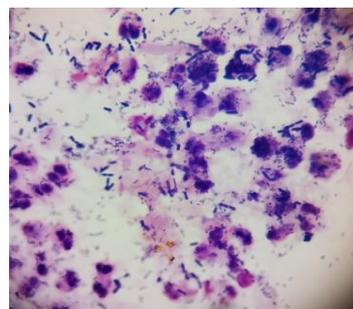


Figura 7: Esfregaço de pús, corado por Gram, onde é possível observar leucócitos e bacilos Gram positivo (Microbiologia do CHTV).

- ✓ Microrganismos mais frequentes: *Enterobacteriaceae*, *Candida spp*, *Neisseria spp*.

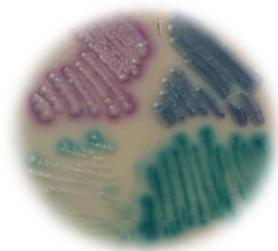


Figura 8: Meio CandiSelect 4, com *Candida spp*. (Microbiologia do CHTV).

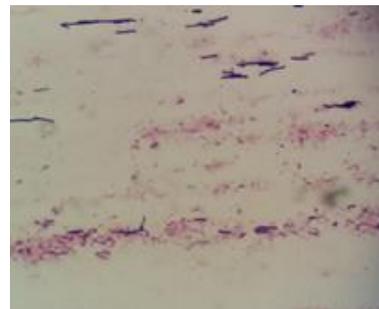


Figura 9: Esfregaço de exsudado vaginal, corado por Gram, onde se observam bacilos Gram positivos (Microbiologia do CHTV).

➔ Líquido Cefalorraquidiano (LCR)

O LCR é considerado uma amostra de emergência médica, uma vez que a infecção ao nível das meninges é uma situação grave, por isso o processamento deve ser imediato.

As amostras de LCR são colhidas pelo clínico através de punção lombar e devem ser enviadas ao laboratório imediatamente. Deve ter-se em conta o seguinte procedimento:

- Observação macroscópica: registo do volume, avaliação da turvação.
- Exame citológico: contagem de leucócitos, observação da sua morfologia (mono ou polimorfonucleares) e eritrócitos.
- Coloração de Gram: forma rápida de fornecer informação ao clínico quanto à possibilidade da presença de agentes patogénicos.
- Centrifugação: 10 minutos a 3000 g.
- Exame cultural: GS, GChoc, incubados a 37°C com 5% de CO₂ e SGC incubado a 37°C ambos num período de 72 horas. Inoculando sempre em meio líquido BH, que incuba em aerobiose a 37°C.

Para além destes procedimentos, existe um Sistema Film Array que tem por base uma técnica de Biologia Molecular. Este sistema faz a identificação de 14 tipos de agentes causadores de meningite e encefalites entre eles, bactérias, vírus e fungos.(7)

Quando em comparação com os métodos convencionais a tecnologia do Film Array tem vantagem na medida em que reduz o tempo para a obtenção de resultados em apenas 1 hora.(7)

→ Líquidos de cavidades serosas

Os líquidos de cavidades serosas (pleural, peritoneal, ascítico, sinovial), são produtos normalmente estéreis, daí que qualquer microrganismo que se desenvolva tem de ser valorizado.

É realizado o exame citológico, um esfregaço corado pelo método de Gram e o exame cultural nos meios GS, GChoc e MAC. Caso o clínico solicite a pesquisa de fungos é também inoculado no meio SGC.

→ Raspado de córnea e córnea

Não são amostras muito frequentes. No entanto, na minha passagem pela Microbiologia contactei com este produto.

A colheita das amostras do raspado de córnea e córnea é realizada pelo Oftalmologista. O médico solicita previamente ao laboratório os meios de cultura necessários e lâminas. Nos meios de GS e GChoc procede à inoculação e nas lâminas realiza os esfregaços. Ao laboratório, só são enviados os meios de cultura e dois esfregaços. Os meios incubam durante 24 horas a 37°C com 5% de CO₂ e os esfregaços corados pela coloração de Gram e posteriormente visualizados.

À partida são amostras de locais estéreis, assim todo o crescimento que se observar tem de ser valorizado.

7.5 - Identificação Bacteriana (ID)

Para a identificação bacteriana feita no laboratório de Microbiologia, são utilizados alguns métodos manuais (Tabela 9).

Tabela 9: Métodos manuais de identificação bacteriana.(1,8)

Provas de enzimas específicas

- **Coagulase** – Plasma de coelho + Colónia isolada da cultura em estudo.
Reação Positiva: Formação de coágulo ao fim de 4h/ 37°C.

- **Urease** – hidrólise da ureia por ação da urease com produção de amónia, o meio fica alcalino e há viragem da cor.
Reação positiva: Desenvolvimento de cor vermelha.

- **Catalase** – $2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
Reação positiva: Observação de efervescência.

- **Oxidase** – Citocromo c reduzido \longrightarrow Citocromo c oxidado
Citocromo c oxidado + p-fenilenodiamina \longrightarrow citocromo c reduzido + p- fenilenodiamina oxidado
Reação positiva: Desenvolvimento de cor azul-roxo em mais ou menos 10'.

Teste presuntivo de diagnóstico

Optoquina: inibe o crescimento de *Streptococcus pneumoniae*, provocando um halo de inibição (\geq 19mm) da cultura em placa.

Testes para detecção de antígenos

- **Slidex Strept.** – Prova de aglutinação para detecção de grupos, segundo classificação de Lancfield.
Reação positiva: Presença de aglutinados vermelhos em fundo verde.

- **Slidex Staph.** – Prova de hemaglutinação para detecção de *Staphylococcus aureus*.
Reação positiva: hemaglutinação ao fim de 15'.

- **Pesquisa de Antígenos na urina** – Pesquisa de antígeno *Legionella pneumophila* e *Streptococcus pneumoniae*.
Reação positiva: No teste imunocromatográfico quando surge uma banda para além do controlo.

Identificação baseada em testes bioquímicos

- **API Campy**
- **BBL** – Sistema de identificação para bactérias Gram positivas aeróbias, utilizam substratos fluorogénicos e cromogénicos que podem ser ou não hidrolisados pelo microrganismo.

São sobretudo métodos manuais em que a maior parte tem como base um procedimento que utiliza colônias puras de culturas que têm 18h-24 horas de incubação, exceto no caso da pesquisa de antígenos da *Legionella pneumoniae* e *Streptococcus pneumoniae*, que são realizados diretamente do produto em estudo (urina).

Quando a quantidade de microrganismo é significativa numa cultura, o laboratório de Microbiologia tem de dar resposta ao clínico sobre qual o agente patogénico responsável pela infeção e o respetivo antibiograma. No entanto, há situações em que o número de microrganismos na cultura não se encontra em número significativo, mas como são amostras obtidas a partir de um local estéril, todo o crescimento tem de ser valorizado.

Por um lado, a identificação passa por alguns testes manuais como já referi em que de certa forma ajudam a orientar a identificação e escolha das cartas corretas do equipamento automático, por outro lado, o sistema Vitek[®] 2 Compact permite chegar à identificação de diferentes espécies a partir de uma suspensão bacteriana de solução salina, com turvação padronizada segundo a escala de McFarland (Tabela 10).

7.6 - Testes de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA)

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos é um componente fundamental do relatório microbiológico enviado ao clínico.

O TSA realiza-se para os microrganismos responsáveis por um processo infeccioso e que necessite de terapêutica antimicrobiana.(9)

A existência de um equipamento automático, Vitek[®] 2 Compact no laboratório de Microbiologia, permite chegar à identificação e suscetibilidade aos antimicrobianos de diferentes organismos tais como: bactérias Gram positivo, Gram negativo, leveduras e organismos fastidiosos. Para tal são utilizadas cartas de identificação e TSA (Tabela 10). Essas, contêm poços impregnados com antibióticos onde se determina a Concentração Mínima Inibitória (CMI). Os resultados obtidos são interpretados de acordo com as normas da *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)*.

Tabela 10: Cartas de ID e TSA utilizadas para os diferentes microrganismos.

Gram	Carta ID	Turvação	Microrganismo/característica
Positivo	GP	0.5 – 0.6 McF	<i>Staphylococcus spp.</i> <i>Streptococcus spp.</i> <i>Enterococcus spp.</i>
Negativo	GN	0.5 – 0.6 McF	<i>Enterobacteriaceae spp.</i> Bacilos Gram negativos não fermentadores
Leveduras	YST NH	1.8 – 2.20 McF 2.70 – 3.30 McF	<i>Neisseria spp.</i> <i>Haemophilus spp.</i>

Em situações em que o resultado da CMI não é determinado pelo equipamento ou não é credível, recorre-se a métodos manuais, como no caso do *Haemophilus spp.* e *Neisseria spp.* para determinação do TSA. Um dos métodos utilizados é o Método de Kirby-Bauer que explico de seguida.

a) Método de Kirby-Bauer modificado (difusão em disco)

Este método é utilizado para os TSA manuais e com o seguinte o procedimento:

- Prepara-se uma suspensão bacteriana com 0,5 McFarland a partir de uma colónia com tempo de incubação 18-24 horas;
- Utiliza-se uma gelose Mueller-Hinton (MH) com 5% de sangue pois este permite o crescimento de microrganismos mais exigentes e de crescimento lento (ex: *Streptococcus spp.*, *Listeria spp.*, *Neisseria spp.*) ou utiliza-se gelose de Chocolate para *Haemophilus spp* e *Moraxella catarrhalis*;
- A partir da suspensão bacteriana preparada, inocula-se os meios escolhidos de acordo com o microrganismo, recorrendo à técnica de sementeira em toalha, que consiste em cobrir bem a superfície do meio com a suspensão;
- Colocam-se os discos impregnados com o antibiótico (selecionados de acordo com o microrganismo identificado e das recomendações EUCAST) com uma pinça estéril, na superfície da gelose;
- Após colocação dos discos, os meios incubam em atmosfera de aerobiose a 35- 37°C, em alguns casos pode ser com 5% de CO₂, durante 18-24 horas.(1)

Após incubação procede-se à leitura e interpretação através da medição do diâmetro da zona de inibição com a ajuda de uma régua, convertendo os respetivos halos em: Sensível (S), Intermédio (I) Resistente (R), de acordo com as recomendações da EUCAST referente ao diâmetro dos halos de inibição dos microrganismos testados.(1)

b) Método E-test

O método E-test é utilizado para obter a CMI da penicilina e cefotaxime ou ceftriaxone para *Neisseria meningitidis*; para confirmação da CMI da penicilina, do cefotaxime e da vancomicina para o *Streptococcus pneumoniae*, para a determinação da CMI da vancomicina para o *Enterococcus spp* e *Staphylococcus aureus*; para confirmar ou determinar a CMI ao imipeneme para os bacilos de Gram negativo e para confirmar mecanismo de resistência de estirpes produtoras de β -Lactamases de Espectro Alargado (ESBL).(1)

Para a realização do Método E-test, o procedimento consiste na realização de uma suspensão bacteriana e inoculação do meio de cultura, conforme já descrito para o método de Kirby-Bauer modificado. A diferença consiste na utilização de uma tira E-test, em vez de discos, que com a ajuda de uma pinça estéril coloca-se sobre o meio inoculado com a suspensão bacteriana. A incubação é exatamente igual ao método descrito anteriormente.(1)

A leitura e interpretação é feita após o tempo de incubação cumprido. Ao fim do qual, observa-se uma zona de inibição elipsoidal e simétrica, onde o valor da CMI é obtido no ponto em que o extremo da inibição da elipse interceta a tira E-test.(1)

c) Pesquisa de mecanismos de resistência

Cada vez mais existem bactérias multirresistentes, que são uma preocupação acrescida para a saúde pública. Assim, deve haver um controlo rigoroso do uso dos antibióticos para tentar minimizar as resistências encontradas.

No laboratório de Microbiologia do CHTV, pesquisam-se alguns mecanismos de resistência para *Haemophilus spp*, *Moraxella catarrhalis* e *Neisseria spp*. e para outras estirpes se houver indicação para tal. Essa pesquisa é feita recorrendo a alguns métodos, tais como:

1. Detecção da produção de β -Lactamases – por hidrólise de uma cefalosporina cromogénia - nitrocefina, impregnado em discos de papel. A cor inicial é amarelo-alaranjado passa a vermelho se houver hidrólise.(1)
2. Detecção da produção de β -Lactamases de Espectro Alargado (ESBL) – usando uma tira E-test que apresenta num dos extremos um gradiente de concentração de uma cefalosporina de 3ª e 4ª geração e no outro extremo um gradiente de concentração da mesma cefalosporina e ácido clavulânico.(1)
3. Detecção da resistência do *Staphylococcus aureus* à meticilina – é obtida pela determinação da CMI da cefoxitina e/ou oxacilina a partir do equipamento automático Vitek® 2 Compact.(1)

Quando é detetada a presença de qualquer resistência, o laboratório tem de reportar os resultados à Comissão de Controlo de Infecção do Hospital através de um protocolo próprio.

Os mecanismos de resistência também são sujeitos ao Controlo de Qualidade, recorrendo a estirpes padronizadas ATCC (*American Type Culture Collection*).⁽¹⁾

SEROLOGIA INFECCIOSA

No laboratório de Microbiologia, está ainda inserido o laboratório de Serologia Infeciosa, onde são realizadas as provas serológicas, tais como: provas de aglutinação e testes imunocromatográficos.

As provas de aglutinação, são provas rápidas e utilizadas como despiste, na urgência ou rotina. São provas onde ocorre a reação de aglutinação entre o antigénio e o soro do doente. A reação considera-se positiva quando existe aglutinação (Tabela 11).⁽¹⁾

Os testes imunocromatográficos, são testes rápidos, que ajudam a detetar doenças de forma rápida, segura e eficaz. Quando o objetivo é detetar anticorpos o teste necessita para a conjugação os antigénios e vice-versa. Aquando da adição da amostra os anticorpos nela existente vão ligar-se com os antigénios. Este complexo antigénio-anticorpo, flui para a linha de teste onde se liga ao antigénio, resultando a presença de coloração. O fluxo continua até à linha de controlo e as restantes partículas ligam-se ao anticorpo imobilizado, originando uma linha colorida. Se o teste for negativo, apenas aparece uma linha na zona do controlo, não ocorrendo ligações na linha teste (Tabela 12).⁽¹⁰⁾

A serologia infeciosa embora menos requisitada, pode dar informações importantes sobre o agente infecioso, a evolução de uma infeção e estabelecer a natureza da infeção.

Tabela 11: Provas serológicas de aglutinação.

Reação de Widal (soro)	Pesquisa de anticorpos específicos do género <i>Salmonella</i>.
Reação de Wright e Rosa Bengala (soro)	Pesquisa de anticorpos específicos dos antígenos <i>Brucella abortus</i> .
Reacção Weil- Félix (soro)	Pesquisa de anticorpos do género <i>Rickettsia</i> por meio de antígenos, preparados a partir de <i>Proteus</i> .
RPR e VDRL (soro)	Reação serológica que deteta IgG e IgM (reaginas), que reagem contra lípidos das células infetadas do hospedeiro (métodos não treponémicos, RPR e VDRL) ou antígenos de <i>T. Pallidum</i> (métodos treponémicos). O RPR e VDRL são métodos inespecíficos e medem a aglutinação do antígeno cardiolipina com os anticorpos do soro do doente, sempre que positivos devem ser confirmados por testes mais sensíveis. (10)

Tabela 12: Testes imunocromatográficos.

Pesquisa de Antígenos de Adenovirus e rotavírus (amostras fecais)	O Adenovirus, agente etiológico que pode afetar o sistema respiratório, ocular ou gastrointestinal. O Rotavirus está associado às gastroenterites e diarreias em crianças.
Pesquisa de Antígenos de <i>Strep. Pneumoniae</i> (urina)	Permite auxiliar no diagnóstico de pneumonia e meningite pneumocócica.
Pesquisa de Antígenos de <i>Legionella pneumophila</i> (urina)	Permite diagnosticar a doença provocada por <i>Legionella pneumophila</i> .

8. LABORATÓRIO DE HEMATOLOGIA

A Hematologia é uma área laboratorial importante que faz análise dos elementos figurados no sangue, avalia o estado das células sanguíneas, dos órgãos hematopoiéticos e as doenças subjacentes. Nesta área laboratorial, estão alguns dos exames mais requisitados pelos clínicos como é o caso do hemograma e a velocidade de sedimentação.

Na minha passagem pelo laboratório de Hematologia, integrei a rotina do mesmo, manuseando os equipamentos que fazem parte da secção (à exceção dos equipamentos de citometria de fluxo), realizei manutenções diárias e participei no processamento das amostras. Intei-me do funcionamento global, organização e metodologias da área laboratorial.

Adquiri noção das diferentes fases de processamento dos exames laboratoriais ao participar na receção das amostras, processamento das mesmas e acompanhamento da validação.

Percebi a análise dos resultados fornecidos pelos analisadores automáticos, a necessidade de repetição e/ou observação microscópica do esfregaço de sangue periférico, tendo por base critérios como o diagnóstico, idade, presença de alertas, alterações nos histogramas e histórico do doente.

Durante o tempo que permaneci nesta área laboratorial e para melhor entender a morfologia das células sanguíneas realizei e observei vários esfregaços de sangue periférico, que permitiu uma melhor compreensão de como algumas alterações do hemograma realizado no equipamento automatizado implicam ou não a observação do esfregaço.

8.1 - Princípio de Coulter ou Impedância

A contagem de células sanguíneas é feita no equipamento Beckman Coulter Unicel Dxh 600, que permite uma análise quantitativa e diferencial dos leucócitos, eritrócitos e plaquetas.

O equipamento utiliza o Princípio de Coulter ou Impedância elétrica, este baseia-se na medição de alterações de corrente elétrica produzida na passagem de partículas, mais propriamente de células sanguíneas, através de um orifício situado entre dois eléctrodos.(11)

As células estão suspensas num diluente (solução condutora), passam através da abertura do tubo de vidro gerando uma diferença de potencial entre os eléctrodos submersos (Figura 10). Assim, é gerado um impulso eléctrico que é contado e medido. O

número de impulsos elétricos indica o número de células contadas enquanto o tamanho do impulso elétrico é proporcional ao volume das células.(11)

Existem duas câmaras de contagem. Na câmara de análise dos eritrócitos, os impulsos gerados podem ser diferentes e assim faz-se a diferença das células. Se o impulso estiver compreendido entre 36 e 360 fl são considerados eritrócitos. Se o impulso for de 2 a 20 fl, são classificadas como plaquetas. Em relação aos leucócitos a sua contagem é feita numa segunda câmara.

(12)

O Unicel Dxh 600 da Beckman Coulter, tem por base a Tecnologia **VCS**: medições do volume que as células ocupam num diluente isotónico (**V**olume), a corrente que penetra as células e nos dá informação sobre o seu conteúdo, chama-se de **C**ondutividade e existe um raio laser que ao atingir as células provoca dispersão (**S**catter). Conseguimos desta forma obter informação acerca dos lóbulos e granulação dos núcleos das células.

O equipamento para a contagem das células sanguíneas utiliza reagentes tais como: Erythrolise™ e o Stabilyse™, sendo que o primeiro é utilizado para lisar os vermelhos, e o segundo possibilita a contagem dos leucócitos.

8.2 - Hemograma

O hemograma pode ser uma ferramenta importante para avaliação de diversas situações, como no diagnóstico e evolução de doenças hematológicas, deteção de quadros infecciosos e na monitorização da terapêutica, desde que se conheçam as funções celulares e as bases fisiopatológicas das doenças.(13)

O hemograma inclui a enumeração de glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas, bem como a determinação de hemoglobina, hematócrito e índices eritrócitários.(14)

A contagem dos eritrócitos e contagem diferencial dos leucócitos, estão entre os testes mais requisitados pelo clínico ao laboratório. Estas análises são altamente automatizadas.(15)

De entre os valores emitidos pelo equipamento, a observação dos histogramas é muito importante, uma vez que é possível ver a distribuição dos leucócitos com cinco

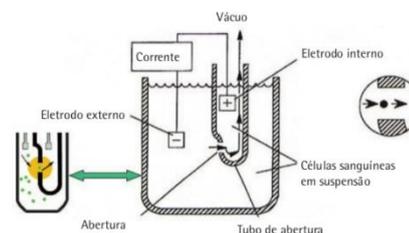


Figura 10: Princípio de Coulter (retirado de www.beckmancoulter.com).

populações representadas, sendo estas neutrófilos, monócitos, basófilos, linfócitos e eosinófilos.

O histograma (Figura 11) é um dos parâmetros que faz triagem dos hemogramas que vão para esfregaço sanguíneo, pois os valores do hemograma podem estar coerentes com a clínica e histórico do doente, mas também não ter as populações bem definidas e assim a validação fica pendente até ser observado o esfregaço de sangue periférico.

O equipamento tem uma série de alertas que indicam possíveis anomalias detetadas aquando da análise da amostra. Na maioria das vezes o aparecimento de alarmes é critério para ser feito o esfregaço sanguíneo. No entanto, pode não se tratar de alterações patológicas, mas sim de erros de análise do equipamento, que às vezes ao ser repetida a amostra não é necessário confirmar pela visualização do esfregaço sanguíneo.

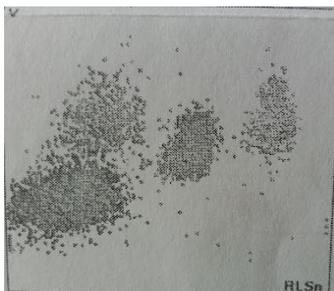


Figura 11: Histograma com distribuição das populações de células sanguíneas (Hematologia do CHTV).

8.3 - Estudo morfológico das células sanguíneas

O estudo do sangue periférico é efetuado quando a clínica ou qualquer alteração inesperada nas contagens e/ou respetivos índices eritrocitários assim o sugiram.(13)

É possível através da visualização do esfregaço sanguíneo e a par com os resultados obtidos pelo analisador automático, observar alterações:

- Eritrocitárias – número, forma, tamanho, conteúdo de hemoglobina, presença de inclusões e possíveis formas imaturas.
- Leucocitárias – número, contagem diferencial manual, presença de formas imaturas, variações na morfologia.
- Plaquetárias – número, morfologia, presença de agregados.

O sucesso para a obtenção de um bom esfregaço sanguíneo, requer uma execução bem feita.

Os esfregaços sanguíneos são feitos com ajuda de um bico plástico próprio para perfurar a tampa dos tubos de EDTA e obter a gota de sangue que é colocada numa lâmina. O espalhador de plástico é colocado num ângulo de aproximadamente 25° a 30° na frente da gota de sangue e recuado até tocá-la. Com um movimento suave e único espelha o sangue. A lâmina deve ser identificada com lápis na extremidade mais fosca da lâmina. Esta deve secar durante algum tempo. Após secagem, procede-se à Técnica de coloração May-

Grünwald-Giemsa. Depois de corada a lâmina é visualizada ao microscópio com o óleo de imersão na objetiva de 100X.

8.4 - Eritrograma

A maioria dos eritrócitos normais tem uma forma de disco bicôncavo. Na distensão corada, apresentam um contorno aproximadamente circular, mostrando apenas pequenas variações quanto à forma e tamanho.(16)

Assim algumas alterações levam à variação na eritropoiese tais como:

Anisocitose – variação no tamanho normal dos eritrócitos. Estes podem apresentar-se mais pequenos ou maiores que o normal, microcíticos ou macrocíticos, respetivamente. A alteração do tamanho dos eritrócitos está associada a algumas patologias. Os eritrócitos microcíticos podem aparecer devido a deficiência de ferro, anemias, hipertiroidismo e algumas intoxicações. Os macrocíticos podem aparecer em situações de doença hepática, anemias por deficiência de Vit. B12 ou ácido fólico e doença pulmonar obstrutiva crónica. No entanto, podem existir situações em que os eritrócitos sejam menores, como nas crianças ou nos indivíduos de raça negra e nestes casos é uma situação fisiológica.(16)

Anisocromasia – reflete a variação de coloração ou de hemoglobinização dos eritrócitos, podendo estes apresentar maior ou menor coloração, hipercromia ou hipocromia, respetivamente.(16)

Pontuado Basófilo – resulta de pequenas inclusões basófilas que contêm RNA, devido à deficiência hereditária de pirimidina 5'-nucleotidase (enzima necessária à degradação de RNA) e pode surgir em situações de intoxicação por metais, anemias hemolíticas.(16)

Formação de Rouleaux – consiste na formação de pilhas de eritrócitos, que lembram moedas empilhadas. Pode ocorrer Rouleaux quando aumenta a concentração plasmática de proteínas de alto peso molecular. Como causas mais comuns temos a gravidez e condições inflamatórias.(16)

Aglutinação de eritrócitos – é a formação de aglomerados irregulares de células. Pode ser observada em casos de contacto com medicamentos intravenosos veiculados em óleos como miconazol, ciclosporina.(16)

Corpos de Howell-Jolly – são inclusões eritrocitárias, de tamanho médio compostas por DNA. Podem observar-se nos eritrócitos em indivíduos normais, mas como são removidos pelo baço não são vistos no sangue periférico. No entanto, em indivíduos

com problemas a nível do baço, os corpos de Howell-Jolly podem aparecer em grande número no sangue periférico. No caso dos recém-nascidos é comum a sua presença, uma vez que o baço é imaturo.(16)

Índices Eritrocitários

Os índices eritrocitários são calculados de forma automática pelo equipamento através dos parâmetros RBC (contagem de glóbulos vermelhos), HGB (hemoglobina) e HCT (hematócrito).(17)

Os índices eritrocitários calculados pelo equipamento são:

Volume Globular Médio (VGM) – corresponde à média do volume ocupado pelos glóbulos vermelhos.

Hemoglobina Globular média (HGM) – avalia a quantidade média de hemoglobina presente nos glóbulos vermelhos.

Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) – concentração de hemoglobina presente nos glóbulos vermelhos.

Variação do Tamanho dos Eritrócitos (RDW) – coeficiente de variação da distribuição do volume dos eritrócitos. Traduz o índice de anisocitose.

Reticulócitos

Os reticulócitos são eritrócitos jovens, recém libertados pela medula óssea. Contêm no seu interior RNA ribossômico, que pela sua exposição a certos corantes, o RNA ribossômico é precipitado e corado, aparecendo como reticulócito. A contagem de reticulócitos reflete a atividade eritropoiética da medula óssea e, portanto, é útil tanto para diagnosticar anemias como para monitorizar a resposta da medula óssea à terapia.(18)

O número normal de reticulócitos independentemente da idade, sexo ou etnia varia de 0,5% a 2%. Quando o número de reticulócitos é superior a 2% significa que a eritropoiese está aumentada, isto pode verificar-se no caso das anemias hemolíticas. A diminuição dos reticulócitos (<0,5%), pode ocorrer em anemias ferriprivas ou magaloblásticas.(19)

Quando há um aumento da produção de eritrócitos como resposta a uma anemia ou terapêutica, existe uma grande libertação de reticulócitos da medula para o sangue periférico.
(19)

8.5 - Plaquetas

As plaquetas não são células, mas sim elementos celulares, formados a partir de uma célula gigante chamada megacariócito. São fundamentais aos processos de interrupção sanguínea, da formação e retração do coágulo.(20)

A contagem de plaquetas, hoje em dia é um dos pedidos mais frequentes e consta no resultado do hemograma que sai do equipamento automático. Pode haver necessidade de uma contagem ao microscópio devido à existência de agregados ou plaquetas gigantes, uma vez que o equipamento pode não fazer uma contagem real do número de plaquetas presentes numa dada amostra.

8.6 - Leucograma

A contagem diferencial de leucócitos ou fórmula leucocitária são expressas em percentagem ou valor absoluto. As contagens diferenciais ao microscópio são satisfatoriamente exatas, mas pouco reprodutíveis, ao passo que as contagens automatizadas são muito reprodutíveis, mas algumas vezes, pouco exatas.(16)

Os leucócitos normalmente presentes no sangue periférico podem ser classificados como: **Granulócitos:** Neutrófilos, eosinófilos, basófilos; **Linfócitos e Monócitos.**

8.7 - Interpretação dos parâmetros do hemograma

- **Série Vermelha**

A alteração mais frequente e relevante da série vermelha é a anemia. De uma forma resumida a anemia é uma redução da quantidade de hemoglobina presente nos eritrócitos.

Um dos índices mais importantes para a classificação morfológica das anemias é o VGM, que permite classificar a anemia como microcítica, normocítica ou macrocítica (Tabela 13).(21)

Tabela 13: Classificação de anemias segundo o VGM e suas patologias.(16)

Tipo de Anemia e (VGM)	Patologias
Anemia Microcítica (VGM <80fl)	Deficiências em ferro, anemia das doenças crônicas (ex: lúpus eritematoso sistêmico, doença hepática crônica, artrite reumatóide, tuberculose).
Anemia Normocítica (VGM 80-96fl)	Anemias hemolíticas, insuficiência renal.
Anemia Macrocítica (VGM >96fl)	Anemia megaloblástica, alcoolismo, anemia aplástica, drogas.

Outro índice que nos ajuda a avaliar a anemia é o CHCM. Se este estiver reduzido classificamos como hipocrômica, se estiver aumentado hiperocrômica. Ou normocrômica se não houver qualquer alteração (Tabela 14).(21)

Tabela 14: Classificação das anemias segundo o CH7M e patologias associadas.(16)

Tipo de Anemia e (CHCM)	Patologias
Anemia Hipocrômica (CHCM <27pg)	Deficiência em ferro, doença crônica.
Anemia Normocrômica (CHCM 27-33pg)	Anemia Hemolítica.
Anemia Hiperocrômica (CHCM >33pg)	Esferocitose hereditária.

- **Série branca**

Os leucócitos ajudam na defesa do organismo, no entanto pode haver situações que as funções são alteradas. As alterações da função e número dos leucócitos podem ser associadas a algumas patologias. Assim, é importante ter presente a história clínica para uma melhor avaliação do diagnóstico. As alterações que se verificam nos leucócitos e as patologias onde é frequente aparecerem estão descritas na Tabela 15.

Tabela 15: Alterações que se verificam nos leucócitos e patologias associadas.(16)

Leucócitos	Possíveis alterações dos leucócitos	Patologias
Neutrófilos	Neutropenia (número de neutrófilos inferior a $1,5 \times 10^9/L$)	Indivíduos de etnia africana, infeções virais, bacterianas, fúngicas, drogas, alcoolismo, anemia aplástica.
	Neutrofilia (aumento do número de neutrófilos)	Infeções bacterianas agudas e crônicas, hemorragia aguda, tabagismo, leucemias e síndromes mieloproliferativas.
Eosinófilos	Eosinofilia (número de eosinófilos superior a $400 \mu L$)	Infeção parasitária, drogas, doenças cutâneas.
Basófilos	Basofilia (número de basófilos superior a $150 \mu L$)	LMC, LMA, reações de hipersensibilidade, policitemia vera.
Linfócitos	Linfocitose (aumento do número de linfócitos)	Infeções bacterianas e virais, tabagismo, LLC.
Monócitos	Monocitose (aumento do número de monócitos)	Malária, tuberculose, LMA, artrite reumatóide.

- **Série plaquetária**

O número de plaquetas pode ser normal ou variável. Quando há uma variação do número de plaquetas por défice estamos perante uma trombocitopenia. Quando aumenta o número de plaquetas trata-se de trombocitose.

Tabela 16: Variação do número de plaquetas e possíveis causas.(16)

Variação do número de plaquetas	Patologias
Trombocitopenia	<ul style="list-style-type: none">- Redução na produção: Síndromes mielodisplásicas, Síndrome de Sebastian, Síndrome de Bernard-Soulier, álcool.- Aumento do consumo, da destruição ou remoção: certas infeções virais e bacterianas, abuso de drogas, tromboembolismo venoso, coagulação intravascular disseminada, doenças auto-imunes (lúpus eritematoso sistémico, artrite reumatóide).- Redistribuição anormal das plaquetas: Hiperesplenismo, hipotermia.
Trombocitose	<ul style="list-style-type: none">- Aumento do número de plaquetas: LMC, LMA, policitemia vera, hemorragia, deficiência de ferro.

8.8 - Velocidade de Sedimentação

A Velocidade de Sedimentação dos Eritrócitos, abreviada VS, é um teste que consiste na medição, em milímetros, da sedimentação globular dos eritrócitos por hora. A VS é utilizada como marcador de inflamação, embora pouco específica é requisitada pelos clínicos de forma regular.

No laboratório de Hematologia, para a medição da VS é utilizado um equipamento automático Alifax Test I BCL. Para avaliar a velocidade de sedimentação dos glóbulos vermelhos, este equipamento utiliza os tubos primários de K3-EDTA. A técnica utilizada pelo equipamento é fotometria cinética, em que é medida a velocidade de formação dos agregados de eritrócitos e o seu tamanho na fase de agregação. Para tal realizam-se durante 20 segundos, 1000 medições de densidade ótica. Havendo posteriormente a transformação dessa densidade a na fase de agregação em mm/h.

Assim que o equipamento sofre as manutenções e controlos diários fica apto para processar amostras. O controlo interno consiste em colocar 3 níveis diferentes com valores de turvação conhecidos. Após processamento das amostras todos os resultados são transmitidos *online* para os sistemas informáticos.

8.9 - Hemostase

Os componentes da hemostase incluem o sistema vascular, plaquetas, sistema de coagulação (fatores e inibidores) e sistema fibrinolítico (fatores e inibidores).(22)

O ensaio, metodologias que são mais frequentemente analisados no laboratório de Hematologia são descritos na Tabela 17 bem como o equipamento.

Tabela 17: Ensaios, metodologias e equipamento utilizados para avaliar a Hemostase.

Ensaio	Metodologia	Equipamento
Estudo do sistema de coagulação <ul style="list-style-type: none">• Tempo de Tromboplastina Parcial activada(aPTT)• Tempo de Protombina (TP)	Turbidimetria	ACL Top 700 Ats
Estudo do sistema fibrinolítico <ul style="list-style-type: none">• D-dímeros	Imunoturbidimetria	
Outras provas <ul style="list-style-type: none">• Pesquisa de Anticoagulante Lúpico (AL)		

O sistema hemostático protege o sistema vascular e permite que após uma lesão os tecidos sejam reparados e todas as funções restabelecidas. É um dos mecanismos mais básicos do nosso organismo onde existem inibidores de coagulação e fatores ativadores em equilíbrio. Assim, quando existem desequilíbrios, o sistema hemostático desencadeia fenômenos trombóticos que ajudam a preservar a integridade da circulação e perda de sangue. f&L

A hemostase é regulada por diferentes mecanismos e tem 3 fases fundamentais:

i) Resposta vascular

Quando um vaso sofre lesão a resposta que o organismo dá é constrição. Quando ocorre esta resposta há uma diminuição do fluxo sanguíneo.(22)

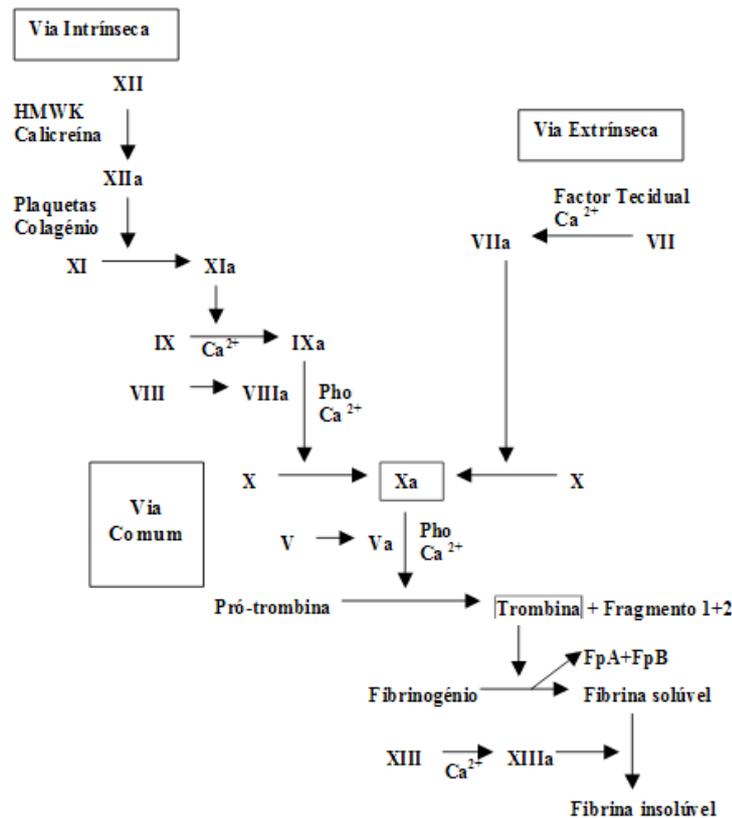
ii) Hemostase primária (formação do trombo plaquetário)

Trata-se de um processo de formação do trombo plaquetário nos locais onde ocorre lesão. A hemostase primária ocorre pouco tempo depois da lesão ter ocorrido e tem um papel importante, pois limita a perda de sangue excessiva.(22)

iii) Hemostase secundária (formação do coágulo de fibrina)

A coagulação sanguínea culmina na formação de trombina em quantidades suficientes para a conversão de fibrinogênio em fibrina. Há uma série de ativações sequenciais dos fatores de coagulação.(22)

A cascata de coagulação é ativada por duas: **via intrínseca ou de contacto** (iniciada por componentes presentes no espaço intravascular) e **uma via extrínseca ou tecidual** é ativada em consequência da lesão vascular. Ambas vão convergir numa via comum que leva à formação de trombina. A cascata de coagulação está representada no esquema 4.(22)



Esquema 4: Representação da cascata de coagulação.(22)

Via intrínseca

O fator XII liga-se ao cininogénio de alto peso molecular (HMWK) e é convertido numa protease ativa (FXIIa). Esta por sua vez, converte o fator XI na sua forma ativa (FXIa) e leva à ativação do fator IX. O fator IXa em conjunto com fator VIIIa, íons de cálcio e fosfolípidos pró-coagulantes são unidades catalíticas necessárias para ativação do fator X.(22)

Via extrínseca

O fator VII na presença do seu co-fator (FT) e íons cálcio permitem a ativação do fator VII. O complexo FVIIa/FT/ Ca^{2+} ativa os fatores IX e X. É o fator X ativado que entra na via comum.(22)

Via comum

Tem início com a ativação do fator X. As duas vias culminam na conversão da pró-trombina em trombina pela ação do fator Xa, de cálcio, do fator Va e de fosfolípidos pró-coagulantes. Após degradação do fibrinogénio pela trombina, libertam-se dois fibrinopeptídeos A e B, dando origem a fibrina solúvel.(22)

ESTUDOS COAGULATIVOS

➤ Tempo de protrombina (TP)

O tempo de protrombina está relacionado com a via extrínseca.

A determinação do tempo de coagulação, consiste na utilização de uma tromboplastina e plasma do doente que ao serem adicionados, incubam durante algum tempo, seguidamente é adicionado cloreto de cálcio.(22)

Após incubação, a intensidade da luz é alterada devido ao aumento da turbidez. A mistura vai-se tornando cada vez mais turva devido à formação do coágulo de fibrina. É o tempo que demora a formação de coágulo de fibrina que determina o tempo de protrombina.(23)

Os resultados são dados em segundos ou taxa de protrombina (%). A fim de diminuir as diferenças entre os vários tipos de testes utilizados, procedeu-se à padronização das tromboplastinas atribuindo-se a cada uma o seu ISI (Índice de Sensibilidade Internacional).

No laboratório é um dos pedidos mais frequentes em termos de coagulação. É sobretudo utilizado no controlo da terapêutica com anticoagulantes orais. Os doentes que fazem esse tratamento têm de manter a sua anticoagulação controlada para prevenção de fenómenos trombóticos.(22)

➤ Tempo de tromboplastina parcial ativado (ATPP)

Consiste no tempo de coagulação do plasma, na presença dos fosfolípidos e de um ativador de superfície que padroniza o início da coagulação pela rápida ativação do fator XII. (22)

O princípio de determinação é em tudo semelhante ao TP.

A medição do APTT é muito utilizada embora em menor quantidade que o TP para monitorizar as terapias à base de anticoagulantes com heparina. Sendo esta um anticoagulante administrado por via injetável usa-se muito em doentes com risco de doença cardíaca.

A presença de alguns inibidores da coagulação e de anticoagulantes pode alterar o APTT. O prolongamento do APTT pode ser suspeito de que há um anticoagulante circulante que pode estar presente em determinadas doenças.(24)

➤ Fibrinogénio

O fibrinogénio (fator I) é uma glicoproteína sintetizada no fígado e está envolvida na parte final da coagulação, que consiste na conversão do fibrinogénio em fibrina pela ação da trombina. Os níveis de fibrinogénio afetam a velocidade de formação do coágulo. É uma proteína de fase aguda como tal está elevada em processos inflamatórios.(24)

Nem todos os equipamentos determinam o fibrinogénio, mas o equipamento utilizado para a coagulação no Serviço de Patologia Clínica do CHTV, permite a quantificação do fibrinogénio pelo método de *Clauss*. Para tal é adicionado um excesso de trombina, para que o tempo de coagulação dependa só do fibrinogénio e não da trombina.

Produtos de degradação da Fibrina

➤ D-dímeros

Os D-dímeros são resultado da ação da plasmina sobre o coágulo de fibrina.(22)

O equipamento faz sua determinação usando uma técnica de imunoturbidimetria. Assim, com a adição de partículas de látex revestidas com um anticorpo monoclonal que tem elevada afinidade para o D-dímero, o anticorpo ao ligar o D-dímero forma um complexo cujo grau de aglutinação é proporcional à concentração dos D-dímeros.(23)

Estudos de Trombofilia

➤ Anticoagulante Lúpico (AL)

Laboratorialmente o estudo do anticoagulante lúpico, faz-se pelo prolongamento do tempo de coagulação. A presença de AL não se encontra associado a fenómenos de hemorragia, mas a uma maior tendência para ocorrência de trombooses.(12)

São utilizados dois métodos para pesquisa de AL: o veneno de víbora de Russell diluído (dRVVT) e o Teste *Silica Clotting Time* (SCT). São realizados dois testes para cada um dos métodos, um teste de *screening* onde são utilizadas baixas concentrações de fosfolípidos, o que resulta num prolongamento do tempo de coagulação e um teste confirmatório onde são utilizadas elevadas concentrações de fosfolípidos para que haja correção do tempo de coagulação, graças à ação neutralizadora que o excesso dos fosfolípidos provoca.(12,23)

A adição do veneno de víbora de Russell diluído vai ativar o fator X da cascata de coagulação levando à formação de coágulo de fibrina.(12,23)

Se um dos testes positivar, a amostra considera-se positiva na pesquisa de AL.

8.10 - Pesquisa de Parasitas

A pesquisa de parasitas no sangue requer a coloração em gota espessa, pois permite que os parasitas fiquem mais concentrados, acelerando a sua pesquisa.(16)

O laboratório de Hematologia não é frequente fazer esta coloração pois com a coloração May-Grünwald-Giemsa obtêm-se bons resultados. Durante a minha passagem pela Hematologia observei um esfregaço de sangue periférico com diferentes fases do *Plasmodium falciparum*. Embora este tipo de organismo não seja muito frequente na rotina, pode observar-se na AEQ.

9. VALIDAÇÃO E EMISSÃO DE RESULTADOS

A validação dos resultados é realizada na fase pós-analítica, após todos os procedimentos técnicos serem finalizados. Sendo este o último passo antes da emissão/impressão dos resultados para o clínico/utente, deve ter-se em conta todos os procedimentos que antecederam ao resultado, existindo assim uma confirmação detalhada dos resultados que não estiverem de acordo com o histórico ou patologia envolvida. A validação biopatológica é feita por pessoal especializado, sendo que este analisa todo o resultado, autêntica e torna disponível o boletim dos resultados. Neste boletim deve constar todas as repetições de colheitas e informações necessárias para a análise do mesmo.

10. CONCLUSÃO

“O mundo das Análises está a ficar cheio”, “qualquer dia não é preciso ninguém no laboratório, as máquinas fazem tudo” fui ouvindo estas frases algumas vezes durante o meu estágio, o que muitas vezes me deixou a pensar será mesmo assim? Será que tenho o futuro comprometido? Pois bem não sei...

A realização do estágio curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, bem como a realização do presente relatório permitiu-me adquirir conhecimentos não só de cariz prático mas também a consolidação de conhecimentos adquiridos durante a fase curricular.

Apesar de já ter estado em contacto com a realidade do laboratório de Análises Clínicas, o estágio foi uma mais valia para mim no sentido de conhecer a realidade de outros serviços, modos de trabalhar e de organização. Portanto posso dizer que foi uma experiência bastante enriquecedora.

O facto de ter realizado o estágio em dois locais diferentes tornou-se muito valioso, porque consegui enriquecer ainda mais os conhecimentos práticos e teóricos. Ter uma maior vivência e alargar mais os horizontes em termos profissionais.

Aquilo que retenho de mais importante na passagem pelos dois laboratórios que escolhi, é que é de extrema importância realizar as tarefas com rigor, existir comunicação entre os elementos da equipa para que as coisas possam fluir e por último, mas não menos importante, assumir os erros e as responsabilidades no laboratório.

Espero assim que o futuro das Análises Clínicas não tenha os dias contados, pois é uma área muito interessante por onde espero continuar o meu trabalho, enriquecendo-me a cada dia com novas experiências, metodologias e muito mais.

II. BIBLIOGRAFIA

1. Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Tondela-Viseu - **Procedimentos em Microbiologia**. Viseu: SPC, 2010.
2. Manual do equipamento ADVIA® Centaur XP. Siemens. [Acedido 15 de abril de 2018]. Disponível em: www.healthcare.siemens.com.
3. GARY, V. Doern - **The Value of Outcomes Data in the Practise of Clinical Microbiology**. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 52 (2014) 1314-1316.
4. L'ETOILE, Marcy - **BioMérieux SA. Vitek® 2 Compact Opération Summary**. France: bioMérieux SA,2005. [Acedido 31 de maio 2018]. Disponível em: www.biomerieux.pt.
5. KONEMAN, E. W., et al. - **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th Ed.**, Lippincott Williams and Wilkins, 2005.
6. Biomérieux. Manual de meios de cultura e suplementos,2003.
7. **Guia Rápido do Film Array® Meningitis/Encephalitis Panel**. France: Biofare-A Biomérieux company. [Acedido em 31 de maio 2018]. Disponível em: www.biomerieux.pt.
8. Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge. **Programa Nacional de Controlo de Infecção. Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em Bacteriologia**. PNCI, INSA, 2004. [Acedido 23 de abril 2018]. Disponível em: www.insa.pt.
9. RHOADS D. Daniel, et al. - **Clinical Microbiology Informatics**. Clinical Microbiology Reviews2014. 27: 1025-1047.
10. KOBAYASHI, G.S., et al. - **Medical Microbiology, 3th Ed**. Mosby Co., 1998.
11. TATSUMI, N, et al. - **Principle of Blood Cell Counter. Development of electric impedance method**. Sysmex Journal Internationa. 9 (1999) 8-20.
12. BAIN J.B., et al. - Dacie and Lewis, **Practical Haematology. 9th edition**. Churchill Livingstone. 2001.
12. DIREÇÃO GERAL DE SAÚDE - **Prescrição e determinação do Hemograma**. Lisboa: DGS, 2011.

14. CENTERS FOR MEDICARE & MEDICAID SERVICES. - **National Coverage Determination (NCD) for Blood Counts**. United States, Baltimore. U.S. Department of Health & Human Services, 2003.
15. **Laboratory haematological changes in the field of intensive care medicine- the extended differential blood count**. 2009 Mar; 44(3):164-70.
16. BAIN Barbara J. - **Morfologia das Células Sangüneas**. Bain Barbara J. Células Sangüneas. Um Guia Prático, 4ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2007. p.73-186.
17. BAIN Barbara J. - **Técnicas de Contagem de Glóbulos**. In: Bain Barbara J. Células Sangüneas. Um Guia Prático. 4ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2007. p.32-72.
18. PIVA E, et al. - **Clinical utility of reticulocyte parameters**. Clinics in Laboratory medicine. 35 (2015) 133-163.
19. CÉSAR, P N., AUGUSTO, F N., - **Completo hematologia eritrócitos**. 2ª Edição. São José de Rio Preto. Brasil, 2008.
20. SOUZA, Mª Helena, ELIAS, D. Oliveira. - **Principios de Hematologia e Hemoterapia**. 2ª Edição.
21. HOFFBRAND A.V. MOSS P.A.H., PETIT J. - **Essential Haematology**. 5nd ed, 2006.
22. MOREIRA A, COELHO T. - **Função hemostática e sua avaliação**. Serviço de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Porto: 2001.
23. CLANDLER, W. et al. - **Handbook of diagnostic hemostasis and thrombosis tests**. 3th Edição. University of Washington. Department of Laboratory Medicine, 2005.
24. MCPHERSON, R., PINCUS, M. - **Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods**. 22rd ed. Saunders Elsevier: 2011.